

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

IN-VITRO-NACHWEIS VON INFEKTIÖSEM PARVOVIRUS B19 UND
ANALYSE DER NEUTRALISATIONSEIGENSCHAFTEN VON
ANTIVIRALEN IMMUNGLOBULINEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Robert Heyd

2012

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

IN-VITRO-NACHWEIS VON INFEKTIÖSEM PARVOVIRUS B19 UND
ANALYSE DER NEUTRALISATIONSEIGENSCHAFTEN VON
ANTIVIRALEN IMMUNGLOBULINEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Robert Heyd

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Susanne Modrow

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Salzberger

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Parvovirus B19	1
1.1.1	Entdeckung und historische Entwicklung.....	1
1.1.2	Taxonomie	1
1.1.3	Morphologie.....	2
1.1.4	Genomstruktur und Sequenzvariabilität	3
1.1.5	Virusproteine	5
1.1.5.1	Strukturproteine VP1 und VP2	5
1.1.5.2	Nichtstrukturprotein NS1	5
1.1.5.3	Weitere Nichtstrukturproteine	6
1.1.6	Epidemiologie und Übertragungswege.....	6
1.1.7	Infektionsverlauf und Virusreplikation.....	7
1.1.8	Krankheitsbilder.....	9
1.1.8.1	Ringelröteln	9
1.1.8.2	Transiente aplastische Anämie	10
1.1.8.3	Hydrops fetalis und intrauteriner Kindstod	10
1.1.8.4	Weitere assoziierte Krankheitsbilder	11
1.1.8.5	Gewebepersistenz von Parvovirus B19	12
1.1.9	Immunantwort.....	13
1.1.9.1	Humorale Phase	13
1.1.9.2	Zelluläre Phase.....	14
1.1.10	Diagnostische Verfahren.....	15
1.1.11	Therapie	15
1.2	Zellkultur	16
1.2.1	Vermehrung von B19V in der Zellkultur	16
1.2.2	Kurzgefasste Darstellung der Erythropoese	17
1.3	Zielsetzung der Arbeit	18

2	Material.....	19
2.1	Chemikalien und Reagenzien	19
2.2	Geräte und technische Hilfsmittel.....	19
2.3	Zellkulturen und Nährmedien	20
2.3.1	PBMCs.....	20
2.3.2	Antikörperproduzierende Hybridomzelllinien.....	21
2.4	Virämisches Blutplasma für die B19V-Infektion	22
2.5	Humane Blutseren für die B19V-Neutralisationsexperimente	23
2.6	Durchflusszytometrie.....	23
2.6.1	Reagenzien und Lösungen	23
2.6.2	Fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Antikörper	24
2.6.3	Durchflusszytometer und Auswertesoftware.....	24
3	Methoden	25
3.1	Zellkultur	25
3.1.1	Gewinnung der PBMCs aus Vollblut	25
3.1.2	Kultivierung der PBMCs	26
3.2	Weitere Komponenten für die Infektionsansätze.....	26
3.2.1	Gewinnung der monoklonalen Antikörper	26
3.2.2	Herstellung der Fab-Fragmente	27
3.2.3	Serumproben von Probanden und Patienten	27
3.3	Infektion der CD36 ⁺ erythroiden Vorläuferzellen	29
3.3.1	Allgemeines Schema.....	29
3.3.2	Infektion mit temperaturbehandeltem Virus.....	29
3.4	Durchflusszytometrie.....	30
3.4.1	Allgemeines Prinzip.....	30
3.4.2	Analyse der Zelldifferenzierung	31
3.4.3	Analyse der Infektionsrate	32
3.5	Datenverarbeitung.....	33

4	Ergebnisse	34
4.1	Übersicht über die Vorgehensweise	34
4.2	Vorbemerkung zur Darstellungsweise der Messwerte	35
4.3	Charakterisierung der Zelldifferenzierung.....	35
4.3.1	Zellzahl im Kulturverlauf	35
4.3.2	Zelldifferenzierung im Kulturverlauf	36
4.4	Infektion der CD36 ⁺ Zellen mit Parvovirus B19	38
4.4.1	Einfluss der Zelldifferenzierung auf die Infizierbarkeit	38
4.4.2	Infektion mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen.....	40
4.4.3	Infektion mit unterschiedlichen Inkubationszeiten.....	42
4.4.4	Einfluss der Temperaturbehandlung auf die B19V-Infektiosität.....	43
4.5	B19V-Neutralisation mit monoklonalen VP1-, VP2- und NS1-spezifischen Antikörpern.....	46
4.6	B19V-Neutralisation mit Fab-Fragmenten der monoklonalen Antikörper.....	48
4.6.1	Berechnung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC ₅₀) der MAbs und ihrer Fab-Fragmente	49
4.7	B19V-Neutralisation mit humanen Seren.....	51
4.7.1	Seropositive und -negative Probanden	52
4.7.2	Patienten mit chronischer Parvovirus-B19-Virämie.....	54
4.7.2.1	Fallbeispiel Patientin SvS	55
4.7.2.2	Fallbeispiel Patientin SiSt.....	57
4.7.2.3	Exemplarische Darstellung einzelner Patientenproben ohne Verlaufskontrollen	59
4.7.3	Neutralisationskapazität von B19V-spezifischem IgG und IgM in verschiedenen Phasen der Infektion	62
4.8	Berechnung der Verfälschung durch virämisches Probenmaterial.....	65

5 Diskussion	66
5.1 Kulturverlauf und Differenzierung der Zellen	66
5.2 Analyse der infizierten Zellen.....	67
5.3 Einfluss von Zelldifferenzierung, Viruskonzentration und Inkubationszeit auf die Infektionsrate	67
5.4 Einfluss der B19V-Temperaturbehandlung auf die Infektiosität.....	68
5.5 B19V-Neutralisation mit monoklonalen VP1-, VP2- und NS1-spezifischen Antikörpern und ihren Fab-Fragmenten	69
5.6 B19V-Neutralisation mit humanen Seren.....	72
5.6.1 Fallbeispiele der chronisch-virämischen Patientinnen SvS und SiSt ..	72
5.6.2 Neutralisationskapazität von B19V-spezifischem IgG und IgM im Infektionsverlauf	74
5.7 Ausblick	76
Zusammenfassung	77
Abkürzungsverzeichnis.....	78
Literaturverzeichnis.....	80
Kongressbeiträge	98
Danksagung.....	99

1 Einleitung

1.1 Parvovirus B19

1.1.1 Entdeckung und historische Entwicklung

Parvovirus B19 (B19V) wurde erstmals 1975 von der australischen Virologin Yvonne Cossart beschrieben (Cossart *et al.*, 1975). Sie untersuchte Blutkonserven hinsichtlich ihres Gehalts an Oberflächenantigen HBsAg des Hepatitis-B-Virus und fand dabei zufällig auf der Testplatte „B“ in der Probe „19“ Auffälligkeiten, die zur Entdeckung des neuen Virus und seiner Namensgebung führten. Erst einige Jahre später konnten Parvovirus B19 konkrete Krankheitsbilder zugeordnet werden, deren Genese bisher unklar war oder ein viraler Ursprung zumindest vermutet wurde. Zuerst waren dies mehrere schwer verlaufende aplastische Krisen bei Kindern mit Sichelzellanämie (Pattison *et al.*, 1981) und die lange bekannte Kinderkrankheit Ringelröteln (*Erythema infectiosum* bzw. *fifth disease*) (Anderson *et al.*, 1983). Besondere Bedeutung kommt der akuten Infektion in der Schwangerschaft zu, da hierdurch die Entwicklung eines anämiebedingten *Hydrops fetalis* zum Tod des Fötus führen kann (Brown *et al.*, 1984). Nicht alle Ziele, die man bei der Erforschung anderer Viren erreicht hat, waren bisher bei Parvovirus B19 möglich. So konnte noch kein zuverlässiges Zellkultursystem etabliert werden, das zur Züchtung großer Mengen an Parvovirus-B19-Virionen in der Lage ist. Darüber hinaus steht noch kein Impfstoff zur Verfügung, der gerade in Anbetracht des Risikos einer B19V-Infektion bei seronegativen Schwangeren und abwehrgeschwächten Patienten von großer Bedeutung sein könnte.

1.1.2 Taxonomie

Die taxonomische Einordnung des Virus erfolgte in die Familie der *Parvoviridae*, deren Vertreter durch die geringe Größe (*parvus* = lateinisch „klein“) ihres unbehüllten Kapsids und das lineare, einzelsträngige DNA-Genom gekennzeichnet sind. Die Familie der *Parvoviridae* wird in die beiden Unterfamilien *Parvovirinae* (pathogen für Wirbeltiere) und *Densovirinae* (pathogen für Wirbellose) untergliedert. Aufgrund seines

Zelltropismus für humane, erythroide Vorläuferzellen wird Parvovirus B19 in der Unterfamilie *Parvovirinae* der Gattung *Erythrovirus* zugeordnet.

1.1.3 Morphologie

Parvovirus B19 gehört mit seinem 18–26 nm durchmessenden, ikosaedrischen (zwanzigflächigen) Kapsid zu den kleinsten Viren und besitzt keine Hüllmembran. Jedes Viruspartikel (Virion) besteht aus 60 Untereinheiten (Kapsomere), die in die beiden Strukturproteine VP1 und VP2 unterschieden werden (Abbildung 1.1). Da VP2 mit etwa 57 Kapsomeren (= 95 %) den größten Anteil am Aufbau des Kapsids besitzt, wird es als *major capsid protein* (Hauptkapsidprotein) bezeichnet. Dementsprechend stellt VP1 mit etwa drei Kapsomeren (= 5 %) je Kapsid das *minor capsid protein* dar (Ozawa *et al.*, 1987a). Die beiden Strukturproteine weisen eine identische Aminosäuresequenz auf und unterscheiden sich nur um 227 Aminosäuren, die das VP1 am aminoterminalen Ende zusätzlich besitzt. Diese Region wird deshalb auch als VP1-*unique region* (VP1u) bezeichnet. Die Ausbildung eines intakten Viruskapsids ist mit dem VP2-Protein, ohne zusätzliche VP1-Komponente, möglich (Kajigaya *et al.*, 1991).

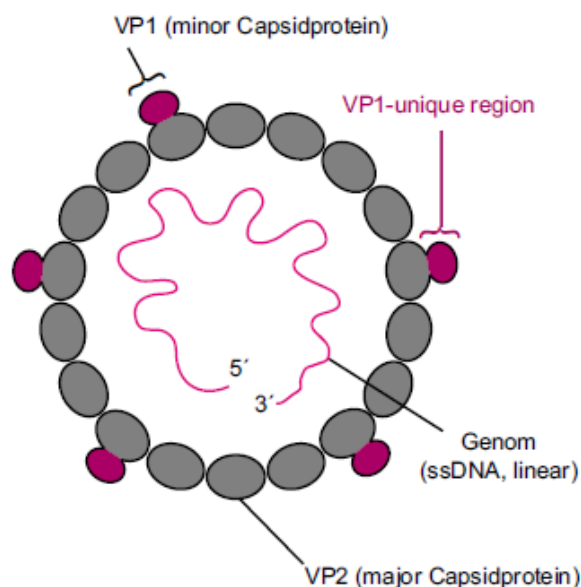


Abbildung 1.1: Aufbau von Parvovirus B19. Schematisch ist ein vereinfachter Querschnitt durch ein Parvovirus-B19-Virion dargestellt, dessen Kapsid aus VP1- und VP2-Proteinen besteht. Das VP1 setzt sich aus dem VP2 und der VP1-*unique region* zusammen. Im nativen Virion enthält das Kapsid 60 Kapsomere, davon 57-mal VP2 und dreimal VP1. Innenliegend befindet sich das einzelsträngige, lineare DNA-Genom (Modrow *et al.*, 2010).

1.1.4 Genomstruktur und Sequenzvariabilität

Parvovirus B19 besitzt ein lineares, einzelsträngiges DNA-Genom mit einer Länge von ca. 5600 Nukleotiden, wovon etwa 4800 kodierend sind (Shade *et al.*, 1986) (Abbildung 1.2). In Virionen konnte DNA beiderlei Polaritäten (Plus- und Minusstrang) mit annähernd gleich häufiger Verteilung gefunden werden (Summers *et al.*, 1983). Es ist aber auch ein ca. 30–40 %iger Anteil DNA-freier Virionen anzunehmen (Bönsch *et al.*, 2008). An den 3'- und 5'-Enden des kodierenden Genoms finden sich palindromische Sequenzen von jeweils 383 Basen, sog. *inverted terminal repeats* (ITR), die aufgrund komplementärer Basenpaarungen die Ausbildung doppelsträngiger Haarnadelschleifen durch Rückfaltung ermöglichen (Deiss *et al.*, 1990). Somit kann das 3'-Ende als Primer für die Replikation fungieren. Es existieren zwei große offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF), die nur auf dem Plusstrang lokalisiert sind (Shade *et al.*, 1986). In Orientierung zum 3'-Ende befindet sich der Leserahmen für die Synthese des Nichtstrukturproteins NS1 sowie derjenige für das 7,5 kDa-Protein. Die 5'-Hälfte enthält den zweiten großen Leserahmen für die Gene der Strukturproteine VP1 und VP2 sowie denjenigen für die 11 kDa-Proteine, die den Nichtstrukturproteinen zugerechnet werden (St Amand und Astell, 1993). Die Kontrolle der gesamten Genexpression wird von einem einzigen Promotor – dem sog. p6-Promotor – übernommen (Blundell *et al.*, 1987), dessen Aktivität vom Nichtstrukturprotein NS1 gesteigert werden kann (Gareus *et al.*, 1998; Raab *et al.*, 2002). Bei der Transkription werden insgesamt neun verschiedene mRNAs gebildet, die außer der mRNA für das NS1-Protein alle durch alternatives Spleißen entstehen (Ozawa *et al.*, 1987a).

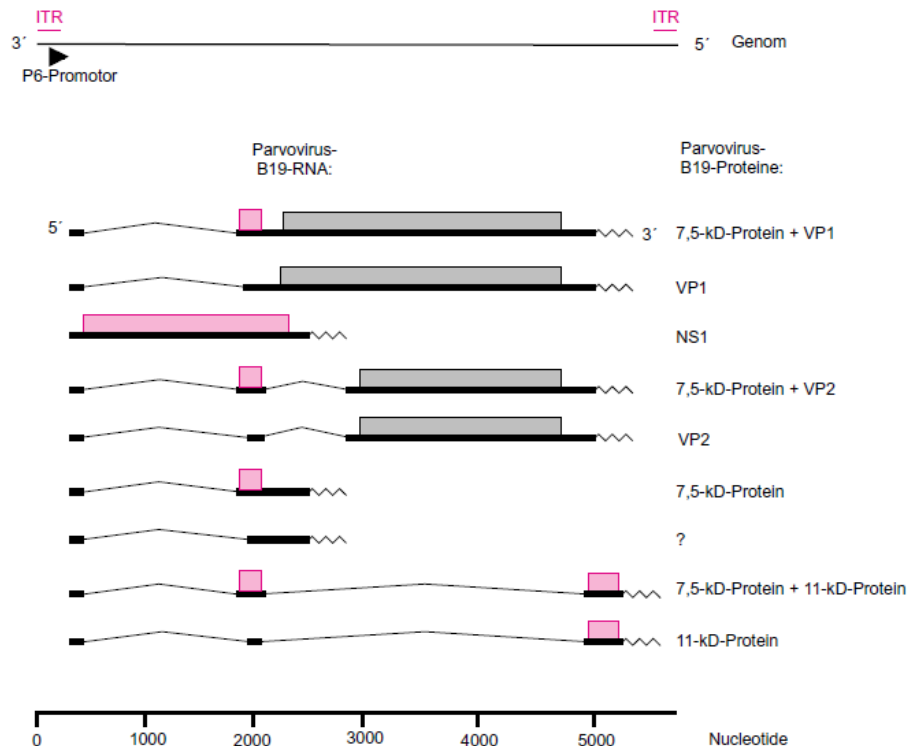


Abbildung 1.2: Genomstruktur von Parvovirus B19 mit kodierten Proteinen. Schematisch dargestellt ist das Parvovirus-B19-Genom mit den ITR (*inverted terminal repeat*)-Sequenzen und dem p6-Promotor. Die Exons sind als dicke, die herausgespleißten Introns als dünne Linien gezeichnet. Die Balken repräsentieren die translatierten Proteine (rot: Nichtstrukturproteine, grau: Strukturproteine). Die gezackten Linien bezeichnen 3'-Polyadenylierungsregionen (Modrow et al., 2010).

Von Parvovirus B19 kennt man drei verschiedene Genotypen (Servant *et al.*, 2002); Genotyp 1 zeigt weltweit die größte Verbreitung (Hübschen *et al.*, 2009). In Gewebebiopsien konnte die gleichzeitige Persistenz der Genome zweier B19V-Genotypen nachgewiesen werden (Schneider *et al.*, 2008); relevante klinische Unterschiede scheinen sich aufgrund der genotypischen Diversität aber nicht zu ergeben. Aufgrund nahezu identischer Eigenschaften, u.a. die Struktur und Immunogenität betreffend, können die Genotypen 1 bis 3 als ein Serotyp angesehen werden (Blümel *et al.*, 2005; Ekman *et al.*, 2007).

1.1.5 Virusproteine

1.1.5.1 Strukturproteine VP1 und VP2

Die Gene der beiden Struktur- bzw. Kapsidproteine VP1 und VP2 liegen überlappend auf dem gleichen, offenen Leserahmen mit jeweils einem eigenen Startcodon (Cotmore *et al.*, 1986; Ozawa *et al.*, 1987a). Das VP1 besitzt eine Molekülmasse von 84 kDa (Ozawa und Young, 1987) und ist um ein 227 Aminosäuren umfassendes Stück am aminoterminalen Ende länger als das VP2 (Cotmore *et al.*, 1986; Ozawa *et al.*, 1987a). Diese Aminosäuresequenz wird als die VP1-*unique region* (VP1u) bezeichnet und als eine oberflächenprominente Struktur am Kapsid angesehen, wie es an rekombinanten Kapsiden gezeigt wurde (Rosenfeld *et al.*, 1992; Kawase *et al.*, 1995). Untersuchungen an nativen Virionen stehen demgegenüber in Kontrast und zeigten eine primär intern gelegene VP1-*unique region*, die z.B. erst bei pH-Erniedrigung, nach thermischer Einwirkung oder Kontakt mit roten Blutzellen externalisiert wird (Ros *et al.*, 2006b). Für die VP1u-Struktur wurde eine Phospholipase-A₂-ähnliche Aktivität beschrieben (Zádori *et al.*, 2001; Dorsch *et al.*, 2002).

Das VP2 besitzt eine Molekülmasse von 58 kDa (Shade *et al.*, 1986; Ozawa und Young, 1987) und vermittelt die Bindung an das Blutgruppen-P-Antigen auf der Zelloberfläche der erythroiden Vorläuferzellen, was für einen erfolgreiche Zelleintritt notwendig ist (Brown *et al.*, 1993). Gentechnisch hergestellte VP2-Proteine lagerten sich in verschiedenen Zellkultursystemen (u.a. Säugetier- und Insektenzellen) zu sog. *virus-like particles* (virusähnliche Partikel, VLPs) zusammen (Kajigaya *et al.*, 1989, 1991). Diese nicht infektiösen VLPs sind bzgl. ihrer strukturellen Eigenschaften (u.a. Antigenität) dem Wildtyp-Virus gleichwertig.

1.1.5.2 Nichtstrukturprotein NS1

Mit 671 Aminosäuren und einer Molekülmasse von 77 kDa stellt das NS1-Protein das größte Nichtstrukturprotein dar (Cotmore *et al.*, 1986; Ozawa und Young, 1987). Es ist für die Vermittlung einer Vielzahl entscheidender Funktionen in der infizierten Zelle verantwortlich. Es interagiert mit den zellulären Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 sowie dem viralen p6-Promoter (Raab *et al.*, 2002). Das NS1 kann den Zellzyklus in infizierten Zellen in der G₁-Phase arretieren, ohne jedoch speziell auf die G₂-Phase

einzuwirken, die aber ebenfalls durch das B19V auf noch ungeklärte Weise beeinflusst wird (Morita *et al.*, 2001, 2003). Weiterhin besitzt das NS1-Protein eine ATPase- und Helikaseaktivität, die entscheidend für die Replikation der viralen DNA sind (Li und Rhode, 1990). Das NS1-Protein besitzt eine hohe Zytotoxizität (Ozawa *et al.*, 1988; Momoeda *et al.*, 1994), die über die Aktivierung der Apoptose erfolgt (Moffatt *et al.*, 1998).

1.1.5.3 Weitere Nichtstrukturproteine

Ein weiteres, in zwei einander ähnlichen Varianten vorkommendes, Nichtstrukturprotein wird aufgrund seiner Molekülmasse als 11 kDa-Protein bezeichnet (St Amand und Astell, 1993). Neueste Untersuchungen deuten darauf hin, dass dieses Protein – mehr noch als das NS1-Protein – über die Auslösung des Caspase-10-Weges an der Einleitung der Apoptose in infizierten erythroiden Vorläuferzellen verantwortlich ist (Chen *et al.*, 2010b).

Das kleinste der Nichtstrukturproteine ist das 7,5 kDa-Protein, das von einem zweiten kleinen offenen Leserahmen kodiert wird. Experimentell gelang seine Expression in infizierten menschlichen Monozyten (Luo und Astell, 1993). Seine Funktion ist bisher unbekannt; eine Rolle bei der Apoptose scheint es nicht zu spielen (Chen *et al.*, 2010b).

1.1.6 Epidemiologie und Übertragungswege

Infektionen mit Parvovirus B19 sind weltweit verbreitet, wobei der Mensch das einzige Erregerreservoir darstellt. Im Allgemeinen erfolgt die Übertragung von Parvovirus B19 aerogen durch Tröpfcheninfektion mittels respiratorischer Sekrete erkrankter Personen. Typischerweise findet die Erstinfektion im Kindes- und Jugendalter statt; mit höherem Lebensalter steigt der Prozentsatz seropositiver Personen in der Bevölkerung. In Deutschland liegt die allgemeine Seroprävalenz in der erwachsenen Bevölkerung bei ca. 72 % und erreicht bei 70-jährigen ca. 80 % (Röhler *et al.*, 2008). Im Kleinkindalter konnte bei 20 % der Kinder ein Viruskontakt durch Seropositivität nachgewiesen werden; bei jungen Erwachsenen traf das auf ca. 67 % zu. Diese altersspezifische B19V-Seroprevalenz ist weitestgehend ebenso im weltweiten Vergleich vorzufinden (Kelly *et al.*, 2000). Der einfache Übertragungsweg der Tröpfcheninfektion führt zu

saisonalen Häufungen bzw. regional begrenzten Ausbrüchen in den Winter- und Frühlingsmonaten. Eine besondere Bedeutung kommt dabei u.a. Kindergärten, Schulen und Gemeinschaftseinrichtungen zu, da in diesem Zusammenhang das Risiko für das beschäftigte Personal (besonders seronegative Schwangere) zu bedenken ist (Adler *et al.*, 1993; Gonçalves *et al.*, 2005).

Eine Virusübertragung ist auch durch die intravenöse Gabe kontaminierter Blutprodukte möglich. Zu nennen sind hier z.B. Erythrozyten- (Hourfar *et al.*, 2011) und Thrombozytenkonzentrate (Cohen *et al.*, 1997) sowie Plasmaprodukte, wie Gerinnungsfaktoren (Blümel *et al.*, 2002; Modrow *et al.*, 2011). Aufgrund der Stabilität des unbehüllten Virus ist es schwierig, geeignete Inaktivierungsmaßnahmen durchzuführen, um eine vollständige Virusinaktivierung zu erreichen (Laub und Strengers, 2002; Blümel *et al.*, 2008). Die Serokonversion sowie der Nachweis von B19V-DNA war in Hämophilie-Patienten nach der Gabe von Faktor VIII- und Faktor IX-Konzentraten nachzuweisen, obwohl eine vorherige Temperaturbehandlung (100°C, 30 min) erfolgte (Santagostino *et al.*, 1997). Patienten, die gehäuft Bluttransfusionen oder humane Blutprodukte benötigen, tragen somit ein erhöhtes Risiko für eine B19V-Infektion. Die Seroprävalenz lag bei Kindern mit Hämophilie mit 92 % deutlich höher als in einer Vergleichsgruppe (Eis-Hübinger *et al.*, 1996). Für Deutschland kann der Anteil B19V-kontaminierter Erythrozytenkonzentrate mit ca. 0,3 % angesetzt werden; von diesen Präparaten sind ca. 5 % hoch mit B19V-DNA ($\geq 10^5$ geq/ml; *genome equivalents/ml*, Genomäquivalente/ml) belastet (Schmidt *et al.*, 2007). Eine daraus resultierende, klinisch relevante Infektion stellt bei Erwachsenen aber ein seltenes Ereignis dar (Plentz *et al.*, 2005).

Die dritte Möglichkeit der Virusübertragung ist die diaplazentare von einer Schwangeren auf den Fötus (siehe 1.1.8.3)

1.1.7 Infektionsverlauf und Virusreplikation

Bei der Tröpfcheninfektion kommt es nach Aufnahme der Viren über die Schleimhaut des Nasen-Rachen-Raumes nach ungefähr einer Woche zu einer mehrere Tage andauernden Virämie, die über 10^{13} geq/ml erreichen kann (Anderson *et al.*, 1985; Kooistra *et al.*, 2011). Der genaue Weg der Viren über die Schleimhaut bis in die

permissiven Zellen im Knochenmark ist zwar nicht bekannt, es wird aber z.B. eine passagere Vermehrung im lymphatischen Gewebe des Nasopharynx vermutet. Als wesentlicher Rezeptor für die Bindung des B19-Virions an seine Wirtszelle wurde das Globosid Blutgruppen-P-Antigen, ein Glycosphingolipid, identifiziert (Brown *et al.*, 1993), was die Eigenschaft zur Hämagglutination von roten Blutkörperchen mit virushaltigem Plasma erklärt (Brown und Cohen, 1992). Bei dem äußerst selten vorkommenden Fehlen dieses Blutgruppen-P-Antigens (Wahrscheinlichkeit von 1:200.000) ließ sich keine experimentelle Infektion von Knochenmarkszellen mit Parvovirus B19 erzeugen, was somit eine „natürliche Resistenz“ darstellt (Brown *et al.*, 1994). Der enge Wirtstropismus zu erythroiden Vorläuferzellen liegt in dieser wesentlichen Rezeptorinteraktion begründet, wobei das Blutgruppen-P-Antigen ebenfalls auf anderen Zelltypen gefunden wurde. So z.B. auf Endothelzellen, Thrombozyten, Megakaryozyten und Fibroblasten, nicht hingegen auf z.B. BFU-E (*erythroid burst-forming unit*) und CFU-E (*erythroid colony-forming unit*) (von dem Borne *et al.*, 1986). Es scheinen aber noch weitere Korezeptoren für den erfolgreichen Eintritt in die Wirtszelle notwendig zu sein (Weigel-Kelley *et al.*, 2001), wie das Integrin $\alpha_5\beta_1$ (Weigel-Kelley *et al.*, 2003) und das Autoantigen Ku80 (Munakata *et al.*, 2005).

Da noch nicht genügend Informationen zum genauen Ablauf der Zellinfektion von B19V vorliegen, muss man sich teilweise an den bekannten Abläufen der tierpathogenen Parvoviren, wie dem caninen Parvovirus oder dem Minute Virus of Mice, orientieren (Cotmore und Tattersall, 2007; Harbison *et al.*, 2008). Nach Bindung der tierpathogenen Parvoviren an ihre benötigten Zellrezeptoren erfolgt die Aufnahme in das Zytoplasma durch Endozytose. In der Nähe des Zellkerns ändert sich durch die pH-Erniedrigung im Endosom die Konformation des Kapsids mit Ausstülpung der VP1-*unique region*, die durch ihre katalytische Phospholipase-A₂-ähnliche Aktivität den Weg aus dem Endosom und Einschleusung in den Zellkern zu bewerkstelligen scheint (Zádori *et al.*, 2001). Die Relevanz der Phospholipase-A₂-ähnlichen Aktivität für Parvovirus B19 zeigte sich bei Mutationen in diesem Bereich mit nachfolgender Unfähigkeit zum Eintritt in den Zellkern (Filippone *et al.*, 2008). Im Zellkern wird das virale Genom mit Hilfe der als Primer wirkenden Haarnadelstrukturen der ITR-Elemente repliziert (Astell *et al.*, 1985). Das bei Parvovirus B19 bei der Translation

gebildete Nichtstrukturprotein NS1 kann über die Bindung an den p6-Promotor die Proteinbiosynthese steigern (Raab *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass der Transport der im Zytosol gebildeten B19V-VP2-Partikel in den Zellkern über eine C-terminale Sequenz (im Sinne eines Kernlokalisierungssignals) erfolgt (Pillet *et al.*, 2003). Der weitere Ablauf zur Bildung der kompletten Virionen mit enthaltener DNA ist aber noch nicht genau bekannt. Da Parvovirus B19 ein unbehülltes Virus ist, scheint seine Freisetzung aus der Zelle nicht durch Exozytose sondern durch Zerstörung der Zelle bzw. Apoptose stattzufinden, wofür auch das NS1-Protein verantwortlich sein dürfte (Moffatt *et al.*, 1998). Zudem wird dem 11 kDa-Protein eine entscheidende Rolle im Apoptoseweg zugeschrieben (Chen *et al.*, 2010b). In permissiven Zellen ist eine vollständige Virusvermehrung möglich, wohingegen es in nicht permissiven Zellen zu einem Block der Transkription kommt (Liu *et al.*, 1992). Als Folge werden nur mehr Transkripte für das zytotoxische NS1-Protein gebildet; die Bildung von Strukturproteinen und die Entstehung von Kapsidstrukturen fehlen völlig.

1.1.8 Krankheitsbilder

1.1.8.1 Ringelröteln

Die häufigste Manifestation einer Parvovirus-B19-Infektion sind die als Kinderkrankheit weltweit auftretenden Ringelröteln, ein teils girlandenförmiges Exanthem im Gesicht sowie am Stamm und den Extremitäten. Diese Erkrankung wird auch als *Erythema infectiosum* bzw. *fifth disease* bezeichnet, da sie neben Masern, Röteln, Scharlach und Windpocken als fünfte exanthemische Infektionskrankheit bei Kindern in Erscheinung treten kann. Von Pädiatern wurde die virale Genese bereits lange vor der endgültigen Identifizierung diskutiert (Balfour, 1969). Im Jahre 1983 wurden dann bei einem Krankheitsausbruch in der Nähe von London Parvovirus-spezifische IgM-Antikörper gefunden, was die vermutete Pathogenese erhärtete (Anderson *et al.*, 1983, 1984). Als pathogenetisch für die Ausbildung des *Erythema infectiosum* werden Virus-Antikörper-Komplexe in den Hautkapillaren mit nachfolgender Entzündungsreaktion angenommen (Schwarz *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1995). Eine artifizielle Infektion erwachsener Probanden imitierte den Weg der natürlichen Tröpfcheninfektion über intranasale Virusinokulation und konnte die

bekannten Krankheitssymptome bei seronegativen Personen zur Ausprägung bringen (Anderson *et al.*, 1985). Hierbei kam es in der ersten Inkubationswoche zu leichten Fieberphasen und grippeähnlicher Symptomatik (Kopf-/Muskelschmerzen, Unwohlsein), in der dritten Woche teilweise zum Vollbild der Ringelröteln sowie gehäuft zu Gelenkschmerzen. Möglich ist aber auch ein asymptomatischer Verlauf, wie er bei ca. 25 % von sich auf natürliche Weise angesteckten Kindern beobachtet wurde (Woolf *et al.*, 1989).

1.1.8.2 Transiente aplastische Anämie

Da das Virus die Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen befällt, kommt es zu deren Zerstörung mit Ausbildung einer Anämie. Diese stellt für eine infizierte Person (Kind bzw. Erwachsener) ohne relevante Grunderkrankungen jedoch in der Regel keine gesundheitliche Beeinträchtigung dar, was auf die kurze Lebenszeit der Erythrozyten und die gesteigerte Retikulozytenproduktion zurückzuführen ist (Chisaka *et al.*, 2003). Liegt hingegen eine angeborene Störung oder eine akute – durch andere Erkrankungen verursachte – Beeinträchtigung der Blutbildung vor, kann es zu einem kritischen Abfall der Erythrozytenzahl sowie der Ausbildung einer aplastischen Krise kommen. Als angeborene Defekte der Blutbildung sind vor allem die Sichelzellanämie (Saarinen *et al.*, 1986), die Thalassämie (Chorba *et al.*, 1986) und die Kugelzellanämie (Hanada *et al.*, 1988) zu nennen. Historisch stellten aplastische Krisen bei Sichelzellanämie-Patienten die erste klinische Manifestation dar, die mit Parvovirus B19 in Zusammenhang gebracht wurde (Pattison *et al.*, 1981; Serjeant *et al.*, 1981).

1.1.8.3 Hydrops fetalis und intrauteriner Kindstod

Eine besondere Bedeutung kommt der B19V-Erstinfektion seronegativer Frauen in der Schwangerschaft zu. Hierbei ist eine Übertragung von Parvovirus B19 diaplazentar auf den Fötus möglich, wobei von einer Transmissionsrate von ca. 33 % und einem Risiko für den B19V-assoziierten, intrauterinen Kindstod von ca. 9 % ausgegangen werden muss (Public Health Laboratory Service Working Party on Fifth Disease, 1990). Das für die Infektion und die Adsorption notwendige Globosid wurde nicht nur als Blutgruppen-P-Antigen auf erythroiden Vorläuferzellen gefunden, sondern auch im

plazentaren Gewebe (Jordan und DeLoia, 1999). Dementsprechend konnte *in vitro* die Bindung von leeren VP2-Kapsiden über diesen Globosid-Rezeptor an Trophoblastzellen gezeigt werden (Wegner und Jordan, 2004). In einer laborchemischen und histologischen Untersuchung von Plazentagewebe bei Z.n. intrauterinem Kindstod war eine produktive B19V-Infektion nachzuweisen (Pasquinelli *et al.*, 2009). Da das Virus nach der Übertragung auf den Fötus dessen erythroide Vorläuferzellen infizieren kann, kommt es zur Entwicklung einer Anämie (Brown *et al.*, 1984), was wieder auf die Induzierung der Zell-Apoptose zurückgeführt wird (Morey *et al.*, 1993). Zudem wurde das Virus in fötalen Myozyten gefunden (O'Malley *et al.*, 2003). Die Folge der fötalen Anämie ist der sog. *Hydrops fetalis*, ein generalisiertes Ödem im fötalen Gewebe, was zum Tod des Föten führen kann. Ein besonders hohes Risiko für die Entstehung eines B19V-induzierten *Hydrops fetalis* besteht bei Infektionen im Zeitraum zwischen der 9. und 20. Schwangerschaftswoche (Enders *et al.*, 2010). Um eine hohe diagnostische Sicherheit über eine etwaige Infektion zu erhalten, ist die PCR den serologischen Methoden (z.B. ELISA) vorzuziehen (Bredl *et al.*, 2011). Der Nachweis viraler DNA ist dabei aus mütterlichem Blut oder der Amnionflüssigkeit möglich (Enders *et al.*, 2008; Bonvicini *et al.*, 2009). Die einzige therapeutische Option bei fötaler Anämie stellt die intrauterine Transfusion von Erythrozytenkonzentraten über die Nabelschnurvene dar (Kempe *et al.*, 2007; Chauvet *et al.*, 2011). Abgesehen von diesem kritisch verlaufenden Bild einer Parvovirus-B19-Infektion in der Schwangerschaft, haben sich für das Virus bisher keine Hinweise auf die Verursachung von Embryopathien ergeben.

1.1.8.4 Weitere assoziierte Krankheitsbilder

Ein weiteres klinisches Symptom einer B19V-Infektion sind Gelenkbeschwerden, die sowohl bei infizierten Kindern als auch bei Erwachsenen auftreten können (Reid *et al.*, 1985). Eine erhöhte Rate wurde aber bei Erwachsenen gefunden, von denen jeder zweite über dieses Symptom berichtete (Cassinotti *et al.*, 1995). Die Beschwerden können für wenige Wochen anhalten und klingen oft spontan ab. Eine Beschwerdepersistenz über einige Monate bis zu mehreren Jahren ist möglich (White *et al.*, 1985). Die klinische Symptomatik mit Gelenkschmerzen kann andere Krankheitsbilder wie z.B. eine Borreliose imitieren und die Therapie zuerst in eine falsche Richtung lenken (Dobec *et al.*, 2008). Zunehmend wird eine Parvovirus-B19-

Infektion auch mit dem systemischen Lupus erythematoses (Díaz *et al.*, 2002; Pavlovic *et al.*, 2010) sowie mit Erkrankungen der Schilddrüse, wie der Hashimoto-Thyreoiditis (Lehmann *et al.*, 2008a) und Schilddrüsenkarzinomen (Adamson *et al.*, 2011) in Verbindung gebracht. Exemplarisch sind hier weitere Krankheitsbilder zu nennen, die mit einer Parvovirus-B19-Infektion in einen möglichen Zusammenhang gebracht werden. Dazu zählen u.a. neurologische Erkrankungen wie Enzephalitis und Meningitis (Bonvicini *et al.*, 2008; Douvoyiannis *et al.*, 2009) sowie die akute (Krygier *et al.*, 2009) und die chronische (Mogensen *et al.*, 2010) Hepatitis. Für die Pathogenese der Hepatitis bzw. eines fulminanten Leberversagens wird die Induzierung der Apoptose in den Hepatozyten durch das NS1-Protein angenommen (Poole *et al.*, 2006).

1.1.8.5 Gewebepersistenz von Parvovirus B19

Charakteristisch für eine B19V-Infektion ist die lebenslange Nachweisbarkeit der B19V-DNA in Körpergeweben (Norja *et al.*, 2006) trotz Vorhandenseins neutralisierender Antikörper (Lundqvist *et al.*, 1999). Ein pathogenetischer Zusammenhang ist nicht immer herzustellen bzw. wird kontrovers diskutiert. So wird z.B. die Persistenz im Myokard mit einer relevanten kardialen Dysfunktion assoziiert (Kühl *et al.*, 2005), wobei Obduktionsergebnisse trotz hoher Virusprävalenz keinen eindeutigen Rückschluss auf eine myokardiale Schädigung ziehen konnten (Schenk *et al.*, 2009). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen zwei Studien, die Myokardbiopsien von Patienten mit Herzinsuffizienz untersuchten und der kardialen B19V-Persistenz einen pathogenetischen Zusammenhang absprachen (Kuethe *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2011). Obwohl das Knochenmark der Hauptort der Virusreplikation ist, war bei asymptomatischen Personen dort die Persistenzrate im Gegensatz zu anderen Körpergeweben geringer ausgeprägt (Corcioli *et al.*, 2008). Charakteristisch ist ebenfalls die Persistenz der B19V-DNA in der Synovialmembran (Söderlund *et al.*, 1997). Vereinzelte Fallberichte beschreiben die Reaktivierung einer früheren B19V-Infektion im Verlauf einer immunsuppressiven Therapie (Klepfish *et al.*, 2006) sowie eine Zweit- bzw. Reinfektion bei Immunsupprimierten (Bremner *et al.*, 1993) oder auch Immunkompetenten (Heegaard *et al.*, 2002; Kaufmann *et al.*, 2007).

1.1.9 Immunantwort

1.1.9.1 Humorale Phase

Die erste Phase der humoralen Immunantwort stellen IgM-Antikörper dar, die in der zweiten Woche ihre höchsten Titer erreichen, was mit einer Abnahme der Virämie einhergeht (Anderson *et al.*, 1985) (vgl. Abbildung 1.3). Diese Antikörper sind vor allem gegen konformationelle Epitope im Bereich des VP1-Kapsidproteins gerichtet (Manaresi *et al.*, 2001). Innerhalb weniger Monate (bis zu einem halben Jahr) verschwinden diese IgM-Antikörper und sind nicht mehr nachweisbar (Erdman *et al.*, 1991; Enders *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass sich die IgM-Antwort proportional zur Virämiehöhe verhält und deshalb bei Kindern mit *Erythema infectiosum* aufgrund einer besseren Immunantwort stärker ausfällt als bei Erwachsenen mit dem gleichen Krankheitsbild (Mortimer, 1996). Ungefähr zwei Wochen nach Infektion können auch IgG-Antikörper nachgewiesen werden. In der Akutphase und der frühen Rekonvaleszenzphase ist die IgG-Antwort vor allem gegen konformationelle und lineare VP2-Epitope gerichtet (Söderlund *et al.*, 1995b). Erstgenannte sind lebenslang nachweisbar, letztere verschwinden nach ca. einem halben Jahr wieder (Söderlund *et al.*, 1995b; Manaresi *et al.*, 1999). Eine komplette Inhibition der Virusinfektiosität konnte experimentell auch durch alleiniges Vorhandensein von Antikörpern gegen die VP1-*unique region* gezeigt werden (Kurtzman *et al.*, 1989). Die entscheidenden Epitope für die Bildung neutralisierender Antikörper wurden im Bereich von VP2 (Sato *et al.*, 1991a, 1991b; Yoshimoto *et al.*, 1991) und der VP1-*unique region* (Saikawa *et al.*, 1993; Dorsch *et al.*, 2001; Zuffi *et al.*, 2001) genauer lokalisiert. Die lebenslange Immunität wird von Gedächtnis-B-Zellen gegen konformationelle Epitope von VP2 und lineare Epitope von VP1 aufrechterhalten (Corcoran *et al.*, 2004). Das Auftreten von Antikörpern gegen das NS1-Protein wird besonders bei der Entwicklung einer chronischen B19V-Infektion beobachtet. Auch bei immunkompetenten Personen kann eine verlängerte Virämie (≥ 6 Monate) mit der Prävalenz von anti-NS1-IgG in bis zu 80 % einhergehen, wohingegen bei nur kurzem Infektionsverlauf ungefähr 20 % der gesunden Personen diese spezifischen Antikörper entwickeln (Hemauer *et al.*, 2000). Inwieweit die NS1-spezifischen IgG-Antikörper als verlässlicher Marker für eine persistierende Infektion oder zur Bewertung eines schweren Krankheitsverlaufs

geeignet sind, wird kontrovers beurteilt (von Poblitzki *et al.*, 1995; Searle *et al.*, 1998; Venturoli *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1999; Lehmann *et al.*, 2002; Kerr *et al.*, 2010). Die Dauer der *Clearance* – die Zeit, bis keine B19V-DNA mehr im Blut nachweisbar ist – kann bei asymptomatischen Patienten oder Patienten mit nur gering ausgeprägter Symptomatik (z.B. grippale Symptome, leichter Hautausschlag) bis zu sechs Monate betragen (Musiani *et al.*, 1995), wobei auch *Clearance*-Zeiten von bis zu 30 Monaten beobachtet wurden (Lindblom *et al.*, 2005).

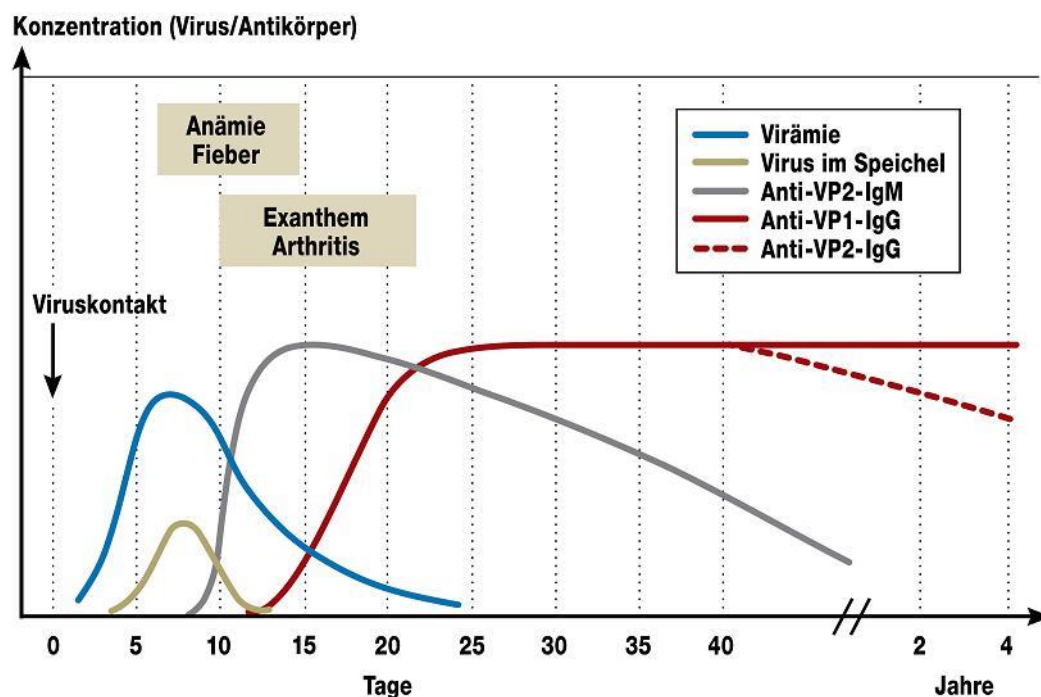


Abbildung 1.3: Immunantwort bei einer Parvovirus-B19-Infektion. Schematisch dargestellt ist der zeitliche Verlauf einer Parvovirus-B19-Infektion mit Nachweisbarkeit des Virus im Blut und Speichel sowie dem Auftreten der spezifischen Immunglobuline und der klinischen Symptomatik (Modrow und Gärtner, 2006).

1.1.9.2 Zelluläre Phase

Im Gegensatz zu den Erkenntnissen über die B19V-spezifische humorale Immunreaktion ist die zelluläre Immunantwort, die über $CD4^+$ T-Helferzellen und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen vermittelt wird, weniger erforscht. Die Stimulation von T-Helferzellen konnte *ex vivo* durch rekombinante Virusproteine (von Poblitzki *et al.*, 1996) und VLPs, bestehend aus VP1/VP2-Kapsiden, (Franssila *et al.*, 2001) gezeigt werden. In Patienten mit erst kürzlich durchgemachter Infektion konnte eine spezifische

T-Helferzellantwort gegen die VP1-*unique region* dargestellt werden (Lindner *et al.*, 2005). Als ein Stimulus für die Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen konnte ein Epitop im Bereich des NS1-Proteins entschlüsselt werden (Tolfvenstam *et al.*, 2001). Ebenso scheinen B19V-spezifische zytotoxische T-Zellen an der Entwicklung einer inflammatorischen Kardiomyopathie beteiligt zu sein (Streitz *et al.*, 2008).

1.1.10 Diagnostische Verfahren

Zum Nachweis einer akuten Parvovirus-B19-Infektion wird mittels ELISA (Anderson *et al.*, 1986) oder Immunblot/Western Blot (Pfrepper *et al.*, 2005) nach VP2-spezifischen IgM-Antikörpern gesucht. Nachweisbare anti-VP2-IgM-Titer zeigen eine frische Infektion an und lassen auf eine noch hohe Virämie schließen (Beersma *et al.*, 2005). Liegen gleichzeitig IgG-Antikörper vor, ist der Übergang ins Rekonvaleszenz-Stadium anzunehmen. Bei alleinig nachweisbarem IgG ist von einer abgelaufenen Infektion auszugehen. Problematisch kann die Beurteilung des Serostatus bei Patienten mit Immundefekten (z.B. angeborene Störungen, HIV/AIDS, Immunsuppression nach Organtransplantation, Steroidtherapie etc.) sein, da hierbei die Antikörperbildung gestört sein kann. Zudem können die zirkulierenden Antikörper im Blut an Viruspartikel gebunden und deshalb im ELISA bzw. Immunblot nicht detektierbar sein, was zu falsch-negativen Serologieergebnissen führen kann (Bredl *et al.*, 2011). Bei dringlicher Klärung des Infektionsstatus bietet sich deshalb die quantitative PCR-Technik (qPCR) an, um die virale DNA nachzuweisen (Takano und Yamada, 2007; Compston *et al.*, 2008). Hierfür müssen alle drei Genotypen berücksichtigt und die entsprechenden Primer eingesetzt werden (Servant *et al.*, 2002; Liefeldt *et al.*, 2005).

1.1.11 Therapie

Eine antivirale, medikamentöse Therapie gegen eine Parvovirus-B19-Infektion gibt es nicht. Unkomplizierte Verläufe der Ringelröteln bei immunkompetenten Patienten bedürfen in der Regel keiner Therapie, können aber z.B. zur Fiebersenkung mit Antipyretika behandelt werden. Die bereits erwähnte intrauterine Blutübertragung bei Schwangeren ist die einzige Möglichkeit, einen drohenden Tod des Fötus abzuwenden, sofern der *Hydrops fetalis* rechtzeitig in Screening-Untersuchungen erkannt wird und

die Transfusionsmaßnahme erfolgreich ist. Bei immunsupprimierten Patienten und Patienten mit persistierender B19V-Infektion ist die Gabe von intravenösen Immunglobulinpräparaten in Betracht zu ziehen (Isobe *et al.*, 2004).

Aktuell steht noch kein Impfstoff gegen Parvovirus B19 zur Verfügung. Entsprechende Untersuchungen wurden bereits durchgeführt, so z.B. eine Phase-I-Studie mit rekombinanten, leeren VP1/VP2-Kapsiden (Ballou *et al.*, 2003). Dabei konnte eine erfolgversprechende Produktion neutralisierender Antikörper bei den Probanden verzeichnet werden. Weiterhin stehen noch abschließende Ergebnisse einer US-amerikanischen Phase-I/II-Studie zu einem rekombinanten B19V-Impfstoff aus (B-19 Parvovirus Vaccine Study). Eine aktuelle Studie mit VLPs musste wegen ungeklärter Hautreaktionen frühzeitig abgebrochen werden (Bernstein *et al.*, 2011). Gerade unter dem Aspekt möglicherweise schwer verlaufender B19V-Infektionen bei u.a. Schwangeren und immunkompromittierten Personen erscheint ein Impfstoff erforderlich (Modrow und Bredl, 2010).

1.2 Zellkultur

1.2.1 Vermehrung von B19V in der Zellkultur

Ein geeignetes Zellsystem, das eine Vermehrung von Parvovirus B19 in größerem Maßstab ermöglicht, konnte bisher nicht etabliert werden. Aufgrund des engen Zelltropismus von B19V für erythroide Vorläuferzellen und seiner Zytotoxizität ist die Erforschung von Parvovirus B19 *in vitro* deutlich eingeschränkt. Eine erfolgreiche B19V-Replikation hängt direkt vom Grad der Zelldifferenzierung und der notwendigen Anwesenheit von Erythropoetin ab (Takahashi *et al.*, 1990). Während die CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen noch nicht infizierbar sind, steigt die Infizierbarkeit ausgehend von den BFU-E (*erythroid burst-forming unit*) über die CFU-E (*erythroid colony-forming unit*) und die Erythroblasten zunehmend an (vgl. Abbildung 1.4).

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Zelltypen für die B19V-Vermehrung getestet. Es erfolgten u.a. Versuche mit menschlichen Knochenmarkszellen (Ozawa *et al.*, 1986, 1987b), fötalen Leberzellen (Yaegashi *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1991) und erythroiden Vorläuferzellen, die aus dem Blut der Umbilikalvene gewonnen wurden

(Sosa *et al.*, 1992; Srivastava *et al.*, 1992). Es wurden auch spezielle Krebszelllinien getestet, so u.a. die Megakaryoblasten Leukämie-Zelllinie UT-7/Epo (Shimomura *et al.*, 1992), die Megakaryozyten Leukämie-Zelllinie MB-02 (Munshi *et al.*, 1993) sowie die erythroiden Leukämie-Zelllinien JK-1 (Takahashi *et al.*, 1993) und KU812Ep6 (Miyagawa *et al.*, 1999). Weitere Versuche erfolgten mit Stammzellen bzw. erythroiden Vorläuferzellen, die direkt aus dem peripheren Blut (Serke *et al.*, 1991; Schwarz *et al.*, 1992) abgenommen bzw. durch Apherese (Hemauer *et al.*, 1999) gewonnen wurden. Neuere Arbeiten zeigten, dass $CD34^+$ hämatopoetische Stammzellen aus PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*, periphere mononukleäre Blutzellen) des Vollblutes isoliert und in Kultur zur Vermehrung und Differenzierung in $CD36^+$ erythroide Vorläuferzellen gebracht werden konnten (Freyssinier *et al.*, 1999; Giarratana *et al.*, 2005). Basierend auf dieser Methode wurde die hohe Replikationsfähigkeit dieser $CD36^+$ Zellen für Parvovirus B19 dargestellt (Wong *et al.*, 2008). Eine Vereinfachung stellte die direkte Kultivierung der PBMC-Fraktion ohne vorherige Isolierung der $CD34^+$ Zellen dar, mit der nach zehn Tagen eine ausreichende Anzahl an $CD36^+$ Zellen für die B19V-Infektion zu erhalten war (Filippone *et al.*, 2010).

1.2.2 Kurzgefasste Darstellung der Erythropoese

Da die Erythropoese *in vivo* essenziell für eine erfolgreiche B19V-Infektion ist, wird sie in Abbildung 1.4 schematisch mit ihren einzelnen Reifungsstadien dargestellt; ausgehend vom Knochenmark bis ins Blut. Parallel ist die Expression der immunphänotypischen Zelloberflächenproteine (*cluster of differentiation*, CD) aufgeführt, anhand derer das Reifungsstadium durchflusszytometrisch mit spezifischen, fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern ermittelt werden kann.

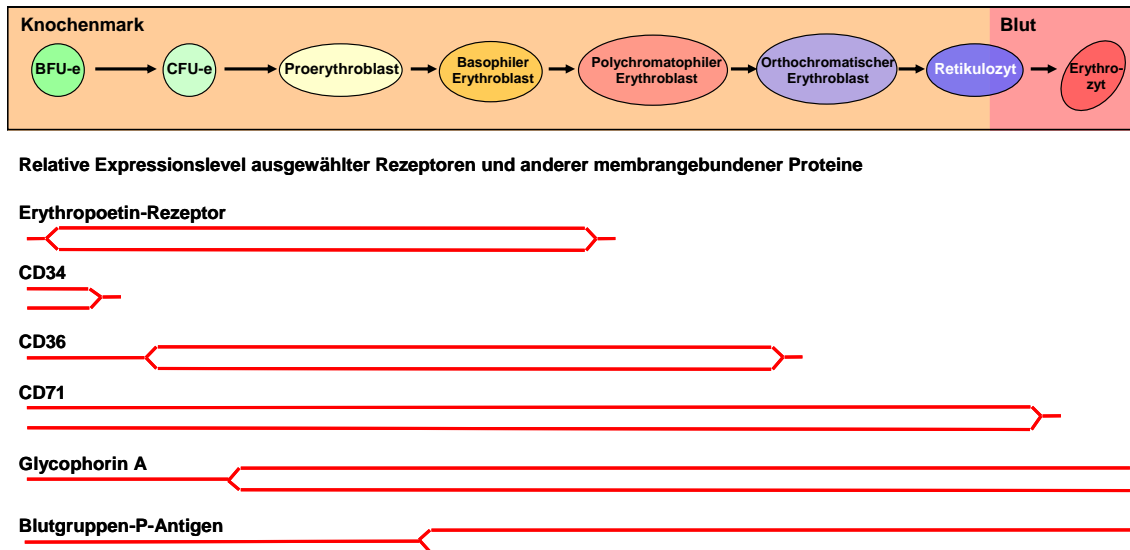


Abbildung 1.4: Übersicht über die Erythropoese. Dargestellt sind die einzelnen Reifungsstadien der Blutzellen ausgehend vom Knochenmark bis ins periphere Blut. Die Auflistung der Expressionslevel immunphänotypischer Zelloberflächenproteine (*cluster of differentiation*, CD) wurde auf die für diese Arbeit relevanten Strukturen beschränkt. Adaptiert und modifiziert nach (Spivak, 2005); das Blutgruppen-P-Antigen wurde ergänzt nach (von dem Borne *et al.*, 1986).
BFU-e: *erythroid burst-forming unit*, CFU-e: *erythroid colony-forming unit*

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, ein Zellkultursystem für die Vermehrung von Parvovirus B19 zu etablieren. Der Nachweis und die Quantifizierung der infektiösen Viren sollten mittels durchflusszytometrischer Detektion des viralen, intrazellulären NS1-Proteins erfolgen. Mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen und Inkubationszeiten sollte das Zellkultursystem bzgl. seiner Empfindlichkeit und Vermehrungsfähigkeit getestet werden. Des Weiteren sollte der Einfluss bzw. die Neutralisation der B19V-Infektion durch humane, monoklonale VP1- und VP2-spezifische Antikörper und den von ihnen abgeleiteten Fab-Fragmenten untersucht werden. Durch Vergleich der neutralisierenden Eigenschaft der monoklonalen Antikörper und ihrer Fab-Fragmente sollten die zugrundeliegenden Neutralisationsmechanismen untersucht werden. Mit dem Einsatz humaner Seren von gesunden Probanden sowie Patienten in unterschiedlichen Stadien der B19V-Infektion sollte die Neutralisationsfähigkeit der B19V-spezifischen, im Infektionsverlauf produzierten, Immunglobuline untersucht werden.

2 Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind an entsprechender Stelle mit ihren jeweiligen Herstellerangaben vermerkt. Bei dem verwendeten PBS (*phosphate buffered saline*, phosphatgepufferte Salzlösung), das im Institut hergestellt wurde, handelte es sich immer um die Lösung ohne zweiwertige Kationen (Calcium, Magnesium).

2.2 Geräte und technische Hilfsmittel

Die allgemein verwendeten Geräte, Materialien und Verbrauchsgüter sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Spezielle Materialien sind gesondert an entsprechender Stelle vermerkt.

Material/Gerät	Hersteller
Safety-Multifly 21G Blutentnahme-Set	Sarstedt, Nümbrecht
Serum-Monovette 7,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Luer-Lok-Spritze 50 ml	BD Plastikpak, Drogheda, Irland
Leucosep Röhrchen 50 ml, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Plastikpipetten Cellstar 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson Company, Lewis Center, USA
Pipettenspitzen Safeguard 20 µl, 200 µl, 1000 µl	PEQLAB, Erlangen
Röhrchen, konischer Boden 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturflaschen BD Falcon 75 cm ²	BD Biosciences, Heidelberg
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Brutschrank	Heraeus, Hanau

Neubauer improved Zählkammer	Hecht Assistent, Sondheim
Umkehrmikroskop Wilovert S	Hund, Wetzlar
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
24-Napf-Platten	Becton Dickinson, Heidelberg
Rüttelplatte für Inkubationsplatten	Heidolph Instruments, Schwabach
Rundbodenröhrchen BD Falcon 5 ml	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 2.1: Geräte, Materialien und Verbrauchsgüter.

2.3 Zellkulturen und Nährmedien

2.3.1 PBMCs

Als Blutspender für die Gewinnung der PBMCs fungierten weibliche und männliche Probanden im Alter zwischen 28 und 32 Jahren (Tabelle 2.2). Bei einem Teil der Spender konnte eine bestehende Seropositivität für Parvovirus B19 nachgewiesen werden. Die seronegativen Spenderpersonen zeigten in einer zwischenzeitlichen Analyse des Antikörperstatus keine Serokonversion.

Spenderperson	Geschlecht	Alter	B19V-Serostatus
Sp1	weiblich	28	negativ
Sp2	weiblich	29	negativ
Sp3	weiblich	32	positiv
Sp4	männlich	31	positiv

Tabelle 2.2: Blutspender für die Gewinnung der PBMCs. Aufgeführt sind die vier Spenderpersonen, deren PBMCs für die Durchführung der Experimente verwendet wurden.

Das zur Differenzierung der, in den PBMCs enthaltenen, CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen zu CD36⁺ erythroiden Vorläuferzellen benötigte Nährmedium wurde entsprechend der Publikation von Wong *et al.* hergestellt (Wong *et al.*, 2008); es wurde lediglich um Penicillin/Streptomycin ergänzt (Tabelle 2.3). Verwendung fand das hergestellte Medium als Grundlage für jeden Zellansatz sowie für alle benötigten Verdünnungsreihen.

Komponente	Konzentration	Hersteller
Minimal Essential Medium	Basismedium	Invitrogen, Darmstadt
BIT 9500 Serum Substitute	Verdünnung 1:5	StemCell Technologies, Grenoble, Frankreich
Eisen(II)-sulfat	900 ng/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eisen(III)-nitrat	90 ng/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hydrocortison	1 µM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
rhu Erythropoetin	3 IU/ml	HOSPIRA Enterprises, Hoofddorp, Niederlande
rhu SCF	100 ng/ml	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
rhu IL-3	5 ng/ml	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10 mg)	100 µl/ml	PAN-Biotech, Aidenbach

Tabelle 2.3: Zusammensetzung des Nährmediums.

2.3.2 Antikörperproduzierende Hybridomzelllinien

Die verwendeten monoklonalen IgG-Antikörper (MAb) gegen das virale VP2-, VP1-, bzw. NS1-Protein wurden von immortalisierten Hybridomzellen gewonnen (siehe 3.2.1). Bei diesen Hybridomzellen handelte es sich um humane, antikörperproduzierende Plasmazellen, die mit Myelomzellen fusioniert wurden. Hieraus resultierten Zellen, die keiner Apoptose mehr unterworfen waren, was zu einer prinzipiell unbegrenzten Lebensdauer und Produktion des jeweiligen monoklonalen

Antikörpers führte. Die Hybridomzellen wurden in RPMI-1640-Medium (PAN-Biotech, Aidenbach) kultiviert, dem 10 % fötales Kälberserum (FKS, Gibco/Invitrogen, Darmstadt) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PAN-Biotech, Aidenbach) zugesetzt waren. Verwendet wurden drei Zelllinien, die in der Arbeitsgruppe etabliert wurden (Gigler *et al.*, 1999) (Tabelle 2.4). Da sich in Epitopenanalysen keine Unterschiede zwischen den beiden VP1-spezifischen Antikörpern MAb 1418-1 und MAb 1418-16 ergaben, wurden diese hier als MAb 1418 zusammengefasst. Die Bindungsstelle liegt im Bereich der VP1-*unique region*.

B19V-Antigen	Antikörper (Zelllinie)
Kapsidantigen VP2	MAb 860-55
Kapsidantigen VP1	MAb 1418
Nichtstrukturprotein NS1	MAb 1424

Tabelle 2.4: Antikörperproduzierende Hybridomzelllinien.

2.4 Virämisches Blutplasma für die B19V-Infektion

Das Parvovirus B19 für die Infektionsansätze stammte aus einem hoch virämischen Blutplasma, das uns freundlicherweise von einem Blutspendedienst zur Verfügung gestellt wurde. Das anonymisierte Spenderplasma (arbeitsgruppeninterne Bezeichnung: BP07) wurde in der diagnostischen Abteilung unseres Instituts mittels PCR (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden) auf seinen Gehalt an B19V-DNA untersucht; die Konzentration betrug $1,3 \times 10^{11}$ geq/ml, B19V-Genotyp 1. Im ELISA (*recomWell* Parvovirus B19 IgG/IgM, Mikrogen, Neuried) wurde das Vorhandensein von B19V-spezifischen Antikörpern ausgeschlossen. Das Plasma wurde aliquotiert, bei -80°C gelagert und für alle Infektionsansätze verwendet. Anhand der gemessenen Genomäquivalent-Konzentration wurden die einzusetzenden Virusmengen (MOI, *multiplicity of infection*) eingestellt. Strenggenommen bezeichnet die MOI in der Virologie die berechnete Menge infektiöser Partikel pro Zielzelle. In dieser Arbeit musste dafür behelfsweise die Anzahl der mittels PCR bestimmten Genomäquivalente

verwendet werden, da die direkte Quantifizierung infektiöser Virionen nicht möglich war.

2.5 Humane Blutseren für die B19V-Neutralisationsexperimente

Um die Inhibition der Infektion zu untersuchen, wurden einerseits Serumproben von Institutsmitarbeitern mit bekanntem Serostatus verwendet (siehe 3.2.3). Sowohl Blut von seropositiven als auch seronegativen Probanden wurde eingesetzt. Andererseits wurden Patientenseren verwendet, die teilweise in einer virämischen Phase asserviert wurden. Ein Großteil dieser Proben stammte aus der Kinderrheumatologie des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Gießen und wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Lehmann zur Verfügung gestellt. Die Seren wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.6 Durchflusszytometrie

2.6.1 Reagenzien und Lösungen

Um die Zellen für die durchflusszytometrische Analyse (siehe 3.4) vorzubereiten, wurden nachfolgende Lösungen verwendet, die aus institutseigenem PBS und den jeweiligen Reagenzien hergestellt wurden (Tabelle 2.5).

Reagenzienlösung	Komponenten	Hersteller
Färbepuffer	PBS mit 3 % FKS + 0,1 % Natriumazid	FKS: Gibco/Invitrogen, Darmstadt Natriumazid: Merck, Darmstadt
Formaldehydlösung 1 % und 2 %	PBS mit 1 % bzw. 2 % Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Saponinlösung 0,1 % und 2 %	PBS mit 0,1 % bzw. 2 % Saponin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tabelle 2.5: Reagenzien und Lösungen für die durchflusszytometrische Zellanalyse.

2.6.2 Fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Antikörper

Die durchflusszytometrische Analyse der Zelldifferenzierung wurde mit fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern durchgeführt (Tabelle 2.6) (siehe 3.4.2). Bis auf das Blutgruppen-P-Antigen wurden alle immunphänotypischen Zelloberflächenproteine (*cluster of differentiation*, CD) direkt mit dem jeweiligen fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörper markiert. Es handelte sich dabei immer um Maus-anti-Human-IgG. Das Blutgruppen-P-Antigen wurde zuerst mit einem primären Kaninchen-anti-Human-IgG/IgM, gefolgt von einem sekundären, fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-IgG markiert.

Der Infektionserfolg wurde mit dem fluoreszenzfarbstoffgekoppelten NS1-spezifischen, monoklonalen Antikörper MAb 1424 durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 3.4.3).

Zelloberflächenprotein	Fluoreszenzfarbstoff	Hersteller
CD34	PE-Cy7	eBioscience, Frankfurt
CD36	APC bzw. FITC	BD Pharmingen, Heidelberg; eBioscience, Frankfurt
CD71	PE	BD Pharmingen, Heidelberg
CD235a (Glycophorin A)	PerCP-eFluor	eBioscience, Frankfurt
Blutgruppen-P-Antigen	primär: ohne Farbstoff	Matreya, Pleasant Gap, USA
	sekundär: FITC bzw. Pacific Blue	eBioscience, Frankfurt; Invitrogen, Darmstadt

Tabelle 2.6: Verwendete fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Antikörper für die Durchflusszytometrie.

2.6.3 Durchflusszytometer und Auswertesoftware

Alle durchflusszytometrischen Messungen erfolgten mit dem Gerät FACSCanto II und der Software FACSDiva (beides BD, Heidelberg). Die Endauswertung der Daten wurde mit dem Programm FCS Express 3 (De Novo Software, Los Angeles, USA) durchgeführt.

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Gewinnung der PBMCs aus Vollblut

Die Gewinnung der PBMCs erfolgte aus Vollblut von Institutsmitarbeitern, die sich freundlicherweise für wiederholte Blutentnahmen zur Verfügung stellten. Für einen PBMC-Ansatz wurden 50–100 ml Vollblut verwendet, das mit einem Tropfen Heparin (Ratiopharm, Ulm) versetzt wurde. Alle weiteren zellkulturtechnischen Arbeiten wurden – bis auf die Zentrifugationen – unter der Sterilbank durchgeführt. Leucosep-Röhrchen wurden mit 15 ml Trennmedium Pancoll human (PAN-Biotech, Aidenbach) befüllt und dieses bei 800 x g innerhalb einer Minute durch die im Röhrchen befindliche poröse Polyethylentrennscheibe zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde das Vollblut zu je 15 ml auf die Röhrchen verteilt und mit PBS auf 50 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 800 x g. Die Bremse des Zentrifugenrotors musste dabei ausgeschaltet werden, damit die sich bildende Zellseparationsschicht während der Ausschwingphase nicht wieder zerstört wurde. Nach der Zentrifugation hatten sich im Röhrchen folgende Schichten gebildet (vom Röhrchenboden nach oben): (i) Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten, (ii) Pancoll unter- und oberhalb der Trennscheibe, (iii) Zellfraktion bestehend aus u.a. Lymphozyten, PBMCs und Thrombozyten und (iv) Plasma/PBS-Gemisch. Mit sterilen Plastikpipetten wurde der Plasma-Überstand abgesaugt und die – nur wenige Millimeter dicke – milchig-trübe PBMC-Schicht in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Durch zweimalige PBS-Waschung (Auffüllung auf 50 ml Gesamtvolumen, Resuspension des Zellpellets, 10-minütige Zentrifugation bei 300 x g mit aktivierter Bremse, Verwerfen des Überstandes) wurden die PBMCs von restlichem Pancoll, Plasma und Thrombozyten gereinigt. Schließlich wurde das Pellet in 5 ml Medium aufgenommen und die Gesamtzellzahl mit der Neubauer-Zählkammer aus 10 µl dieser Suspension ermittelt.

3.1.2 Kultivierung der PBMCs

Die PBMCs wurden nach ihrer Separation in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Bodenfläche angesetzt. Je Flasche wurden 25 ml Medium mit einer Zellkonzentration von 10⁶ Zellen/ml eingebracht und die Flaschen im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ gelagert. Regelmäßige Kontrollen im Umkehrmikroskop fanden statt, um die Zellkoloniebildung zu beobachten und eine etwaige bakterielle Kontamination zu erkennen. Am fünften Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um abgestorbenes Zellmaterial zu entfernen und die Zellkonzentration mit 10⁶ Zellen/ml neu einzustellen. Für den Mediumwechsel wurde der Inhalt aller Zellkulturflaschen derselben Spenderperson in 50 ml-Röhrchen überführt und die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 300 x g pelletiert. Nach Resuspension wurden die Zellen mit 50 ml PBS gewaschen (wie vorige Zentrifugation). Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und in neuen Zellkulturflaschen angesetzt.

3.2 Weitere Komponenten für die Infektionsansätze

3.2.1 Gewinnung der monoklonalen Antikörper

Die monoklonalen Antikörper MAb 860-55, MAb 1418 und MAb 1424 wurden aus dem Medium der kultivierten Hybridomzellen (siehe 2.3.2) aufgereinigt. Dazu wurde das gesamte Medium mit den Hybridomzellen steril mit Pipetten aus den Kulturflaschen entnommen, in 50 ml-Röhrchen überführt und der Überstand nach 10-minütiger Zentrifugation (300 x g) gesammelt. Die Proteinaufreinigung mit Protein-G-Säulenverfahren wurde von Herrn Christian Gerdes, einem Institutsmitarbeiter, durchgeführt. Die Konzentration der Antikörperfraktionen wurde mit dem Verfahren nach Bradford bestimmt und die Aliquots bei -80°C gelagert. Die Hybridomzellen wurden je nach Bedarf wieder in neuem Medium aufgenommen und weiterkultiviert.

3.2.2 Herstellung der Fab-Fragmente

Aus den monoklonalen Antikörpern MAb 860-55 und MAb 1418 wurden durch Papain-Spaltung deren Fab-Fragmente hergestellt (Abbildung 3.1). Dafür wurde das Pierce Fab Micro Preparation Kit (Fisher Scientific, Schwerte) verwendet und nach Herstelleranweisung durchgeführt. Die Konzentration der Fab-Fragment-Fractionen wurde mit dem Verfahren nach Bradford bestimmt und die Aliquots bei -80°C gelagert.

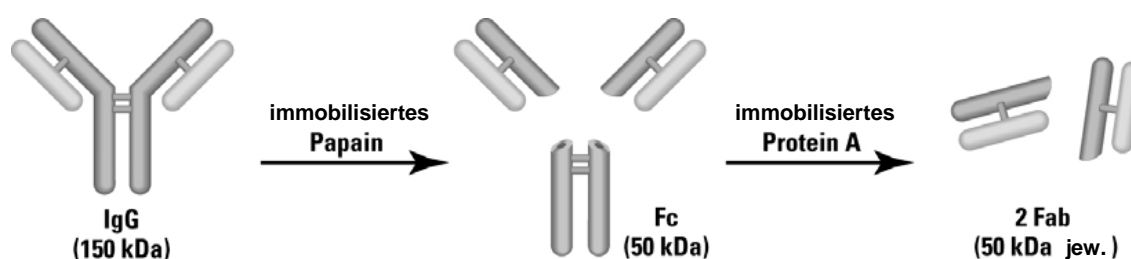


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Spaltung eines IgG-Antikörpers in Fab- und Fc-Fragmente. Die Grafik wurde entnommen aus der Gebrauchsinformation des Pierce Fab Micro Preparation Kit (Fisher Scientific, Schwerte) und modifiziert.

3.2.3 Serumproben von Probanden und Patienten

Institutsmitarbeitern wurde Vollblut mittels 7,5 ml-Serum-Monovetten abgenommen und bei 800 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde steril abgenommen, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die zugeschickten Patientenserumproben wurden ebenfalls so verarbeitet und gelagert. Von allen Probanden-/Patientenproben wurden in der diagnostischen Abteilung die Antikörpertiter (IgG bzw. IgM) mittels ELISA (*recomWell* Parvovirus B19 IgG/IgM, Mikrogen, Neuried; Tabelle 3.1) bestimmt sowie der Gehalt an B19V-DNA (*QIAamp* DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden) bei den Patientenproben, um eine mögliche Virämie zu quantifizieren. Zusätzlich wurde bei allen Serumproben das Antigen-spezifische Bindungsmuster der B19V-Antikörper im Immunblot (*recomLine* Parvovirus B19 IgG/IgM, Mikrogen, Neuried; Tabelle 3.2) untersucht. Für die genaue Testauswertung wird auf die jeweiligen Gebrauchsinformationen der Hersteller verwiesen.

recomWell Parvovirus B19 IgG/IgM ELISA	
Immunglobulinkonzentration [U/ml]	Testergebnis
> 24	positiv
20–24	grenzwertig
< 20	negativ

Tabelle 3.1: Quantitative Auswertung des recomWell Parvovirus B19 IgG/IgM ELISAs. Für weitergehende Informationen wird auf die Gebrauchsinformation des Herstellers (Mikrogen, Neuried) verwiesen.

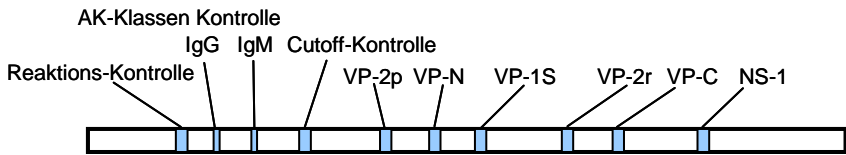
recomLine Parvovirus B19 IgG/IgM Immunblot	
	
Antigenbezeichnung	Beschreibung
VP2 (VP-2p, VP-2r)	Hauptkapsidantigen VP2; IgG-Antikörper gegen Konformations-epitope (VP-2p) sind in der Regel lebenslang nachweisbar, gegen lineare Epitope (VP-2r) nur Monate bis wenige Jahre.
VP-N	N-terminales Fragment des Kapsidantigens VP1; IgG-Antikörper sind oft jahrelang nachweisbar.
VP-C	C-terminales Fragment von VP1 bzw. VP2; IgG und IgM gegen lineare Epitope erscheinen früh im Infektionsverlauf, verschwinden nach einigen Wochen bzw. Monaten wieder.
VP-1S	N-terminales, spezifisches Fragment von VP1 (= VP1-unique region); IgG-Antikörper sind lange nachweisbar.
NS-1	Nichtstrukturprotein 1; erscheint im IgG frühestens 6–8 Wochen nach Infektion bei mind. 20 % der Erkrankten; evtl. Hinweis auf Viruspersistenz.
Die Auswertung der Bandenintensität erfolgte im Bezug zur Cutoff-Bande: „keine Reaktion (-)“ bis „sehr starke Intensität (+++)“.	

Tabelle 3.2: Bandenmuster des recomLine Immunblots. Modifiziert nach: Gebrauchsinformation recomLine Parvovirus B19 IgG/IgM (Mikrogen, Neuried).

3.3 Infektion der CD36⁺ erythroiden Vorläuferzellen

3.3.1 Allgemeines Schema

Für die Infektion wurden die Zellen am zehnten Kulturtag wie vorbeschrieben geerntet und ausgezählt. Die Zellzahl wurde mit frischem Medium auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Aus dem B19V-haltigen Blutplasma BP07 (siehe 2.4) wurden mit Medium Verdünnungen hergestellt, wobei als Maß die MOI benutzt wurde, die standardmäßig für alle Versuche mit 1000 geq/Zelle eingestellt wurde. Zusätzlich wurden durch sequenzielle Verdünnung die MOIs 100, 10, 1 und 0,1 erstellt und damit die Infektion getestet.

Die Infektion erfolgte in 24-Napf-Platten, wovon jeder Napf 100 µl Zellsuspension ($= 5 \times 10^5$ Zellen) und 100 µl Virussuspension ($= 5 \times 10^8$ geq) enthielt. Dazu kamen bei den Neutralisationsversuchen 100 µl der Antikörper- bzw. Serumverdünnung. Es wurden ohne Zwischeninkubationen zuerst die Zellen, dann die Antikörper- bzw. Serumverdünnung und zuletzt die Virussuspension pipettiert. Bei Näpfen ohne Neutralisationszusatz wurden 100 µl Medium als Volumenausgleich zugegeben. Parallel wurden Näpfe mit nicht infizierten Zellen und alleiniger Mediumzugabe als Kontrollen mitgeführt. Nach Pipettieren aller Näpfe (Zwischenvolumen 300 µl) wurden die Platten bei 4°C für 2 Stunden auf einer Rüttelplatte (Frequenz 60/min) inkubiert. Danach folgte die Auffüllung jedes Napfes mit Medium zum Endvolumen von 1 ml und Inkubation der Platten im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ für 24 bis 72 h je nach geplantem Versuchsaufbau.

3.3.2 Infektion mit temperaturbehandeltem Virus

Zur Testung der Infektiosität der Viruspartikel nach thermischer Vorbehandlung wurden verschiedene Versuchsansätze durchgeführt. Einerseits wurden Aliquots des B19V-haltigen Blutplasmas BP07 zu 300 µl für 5 min in einen Heizblock (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg) bei 40°C, 56°C, 60°C und 80°C sowie für 30 min bei 56°C gegeben und danach sofort auf Eis abgekühlt. Daraus wurden Aliquots zu 100 µl auf eine MOI 1000 verdünnt und eingesetzt. Andererseits wurden Aliquots zu 1 ml erstellt, um damit Verdünnungsreihen von MOI 100000 bis MOI 0,1 herzustellen. Diese Aliquots wurden entsprechend bei 60°C für 30 min behandelt und anschließend auf Eis

gekühlt. Da es wegen der Grundkonzentration des Plasmas BP07 ($1,3 \times 10^{11}$ geq/ml) nicht möglich war, die benötigten Genomäquivalente für MOIs größer als 10000 in 100 µl aufzunehmen, wurden diese Verdünnungsreihen deshalb komplett auf eine einzusetzende Virussuspension von 900 µl/Napf eingestellt. Mit den 100 µl Zellsuspension (5×10^5 Zellen) betrug das Gesamtvolumen wieder 1 ml/Napf. Entsprechend den jeweiligen Verdünnungsreihen wurden temperaturunbehandelte Aliquots (Raumtemperatur, RT) parallel eingesetzt.

3.4 Durchflusszytometrie

3.4.1 Allgemeines Prinzip

Die Analyse der kultivierten Zellen bezüglich ihrer Differenzierung zu CD36⁺ erythroiden Vorläuferzellen und der Nachweis der Virusinfektion wurden mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Dieses Verfahren basiert auf den Fluoreszenzeigenschaften der Zellen, wenn sie aus einer Zellsuspension in das Kapillarsystem der Detektorkammer eingesaugt werden und einzeln einen Laserstrahl passieren. Das von den Zellen dabei teilweise gestreute Laserlicht wird von Detektoren erfasst, die damit die Zellen anhand ihrer morphologischen Eigenschaften unterscheiden können. Das horizontal die Zelle treffende und in geringem Winkel gestreute Laserlicht (Vorwärtsstreulicht) wird vom *forward scatter* (FSC) gemessen. Dieses Streulicht wird vor allem von der Zellgröße beeinflusst. Das von der Zelle zur Seite gestreute Licht (Seitwärtsstreulicht) wird vom *side scatter* (SSC) in fast rechtem Winkel erfasst und hängt hauptsächlich von der Granularität (Körnung) des Zellinhalts, wie u.a. Größe und Beschaffenheit des Zellkerns, Anzahl und Größe von Vesikeln ab. Somit ist bereits eine Einteilung in verschiedene Zellpopulationen aufgrund dieser nativen Zelleigenschaften möglich.

Eine weitergehende Charakterisierung jeder einzelnen Zelle wird mit der antikörpervermittelten Fluoreszenzfarbstoffmarkierung möglich. Spezielle Zelleigenschaften, die sowohl extra- als auch intrazellulär gelegen sein können, werden mit spezifischen, monoklonalen Antikörpern detektiert, die bestimmte Fluoreszenzfarbstoffmoleküle gebunden haben. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wird von einem entsprechenden Laser auf einer spezifischen Wellenlänge angeregt und sendet

daraufhin ein Fluoreszenzlicht in einer zweiten Wellenlänge aus, das von einem zugeordneten Detektor erkannt werden kann. Die allgemeine Auswertung der Durchflusszytometrie basiert nun auf der morphologischen Charakterisierung der detektierten Zellen und ihrer prozentualen Verteilung in den Zellpopulationen.

3.4.2 Analyse der Zelldifferenzierung

Zur Messung der Differenzierung der CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen zu CD36⁺ erythroiden Vorläuferzellen und Ermittlung der Infizierbarkeit (Expression von Blutgruppen-P-Antigen) wurden die Zellen am Infektionstag (Tag 10) durchflusszytometrisch untersucht (siehe 2.6). Mit der Neubauer Zählkammer wurde die Gesamtzellzahl in der Suspension ermittelt und 2×10^6 Zellen in ein 5 ml-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation (400 x g, 5 min) wurde der Überstand abgekippt und das Zellpellet in der Restflüssigkeit (Flüssigkeitsrücklauf im Röhrchen von ca. 100 µl) resuspendiert. Jeder weitere Waschschrift wurde ebenfalls mittels Zentrifugation (400 x g, 5 min; Abkippen des Überstands und Resuspension der Zellen) durchgeführt. Nach Waschen mit 2 ml Färbepuffer wurden die fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörper (Tabelle 2.6) für die zu untersuchenden Zelloberflächenproteine hinzugegeben. Jedes Zelloberflächenprotein wurde als Einzelbestimmung in einem separaten Röhrchen angesetzt. Von den Antikörpern für CD34, CD36, CD71 und CD235a wurden 5 µl zugegeben, vom primären Blutgruppen-P-Antigen-Antikörper 2 µl. Nach jeder Antikörperzugabe folgte eine Inkubation (4°C, 20 min) und ein Waschschrift mit 2 ml Färbepuffer. Danach wurde der sekundäre, fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Antikörper für die Detektion des Blutgruppen-P-Antigens mit 5 µl zugegeben. Als Negativkontrolle wurde parallel ein Röhrchen mit ungefärbten Zellen mitgeführt, die ebenso gewaschen und inkubiert wurden. Nach dem letzten Waschen mit 2 ml Färbepuffer wurden die resuspendierten Zellpellets in 500 µl Färbepuffer aufgenommen und die Proben im Durchflusszytometer analysiert.

3.4.3 Analyse der Infektionsrate

Um die Infektionsrate (= prozentualer Anteil der NS1-positiven Zellen) zu bestimmen, wurde das intrazelluläre, virale NS1-Protein mittels des NS1-spezifischen, monoklonalen Antikörpers MAb 1424 detektiert. Der Antikörper wurde mit dem APEX Alexa Fluor 647 Antibody Labeling Kit (Invitrogen, Darmstadt) entsprechend der Herstelleranweisung fluoreszenzfarbstoffgekoppelt. Der eingesetzte Antikörper hatte nach Aufreinigung aus dem Hybridomzell-Überstand (siehe 3.2.1) chargenbedingte Konzentrationen von 1,3 µg/µl und 1,8 µg/µl und wurde nach der Fluoreszenzfarbstoffmarkierung mit 4 µl bzw. 3 µl der fertigen Lösung je Probe eingesetzt. In Anbetracht der vom Hersteller genannten Effizienz war von einer fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpermenge von ca. 1 µg je Probe auszugehen.

Die intrazelluläre Färbung wurde dem Prinzip nach wie die extrazelluläre durchgeführt (siehe 3.4.2), aber mit folgenden Besonderheiten: Nach dem ersten Waschen mit 2 ml Färbepuffer wurden in jedes Röhrchen 500 µl 2 %ige Formaldehydlösung gegeben, was die Fixierung (reversible Vernetzung) der Proteinstrukturen bewirkt. Es folgte eine 15-minütige Inkubationsphase bei Raumtemperatur und Dunkelheit. Danach wurde mit 2 ml Färbepuffer gewaschen. Anschließend wurden in jedes Röhrchen 10 µl einer 2 %igen Saponinlösung gegeben, um die Lipiddoppelschicht der Zellmembran für die intrazelluläre Passage des Antikörpers permeabel zu machen. Vom fluoreszenzfarbstoffgekoppelten NS1-Antikörper wurden o.g. Mengen zugegeben und die Zellen bei 4°C für 20 min inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 2 ml einer 0,1 %igen Saponinlösung, wobei hier die Zentrifugengeschwindigkeit auf 500 x g erhöht wurde. Nach der Resuspension wurden die Zellen in 500 µl einer 1 %igen Formaldehydlösung aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Bei der intrazellulären Färbung wurde eine Negativkontrolle (= nicht infizierte Zellen) mitgeführt, die ebenfalls mit Formaldehyd- und Saponinlösung behandelt wurde. Mit der Zugabe des fluoreszenzfarbstoffgekoppelten NS1-Antikörpers wurde die unspezifische Antikörperbindung und somit ein falsch-positives Fluoreszenzsignal bestimmt. Dieser Werte wurde in der Auswertung den infizierten Proben gegenübergestellt.

3.5 Datenverarbeitung

Der Text, die Datenerfassung und die Grafiken wurden mit den Programmen Word, Excel und PowerPoint für Windows (Office Version 2003, Microsoft Corporation, USA) erstellt. Für Diagramme wurde das Programm SigmaPlot 8.0 (SPSS Inc., USA) verwendet. Die mittlere inhibitorische Konzentration IC_{50} wurde mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, USA) berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Übersicht über die Vorgehensweise

In dieser Arbeit wurde ein *in-vitro*-System für die Infektion mit Parvovirus B19 etabliert, mit dem aus Probandenblut gewonnene CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen mittels eines speziellen Nährmediums vermehrt und zu B19V-permissiven CD36⁺ erythroiden Vorläuferzellen differenziert wurden. Diese Zellen wurden in diversen Ansatzvariationen mit B19V infiziert, der Infektionserfolg im Durchflusszytometer quantifiziert und die B19V-Infektion durch verschiedene Faktoren beeinflusst (Abbildung 4.1).

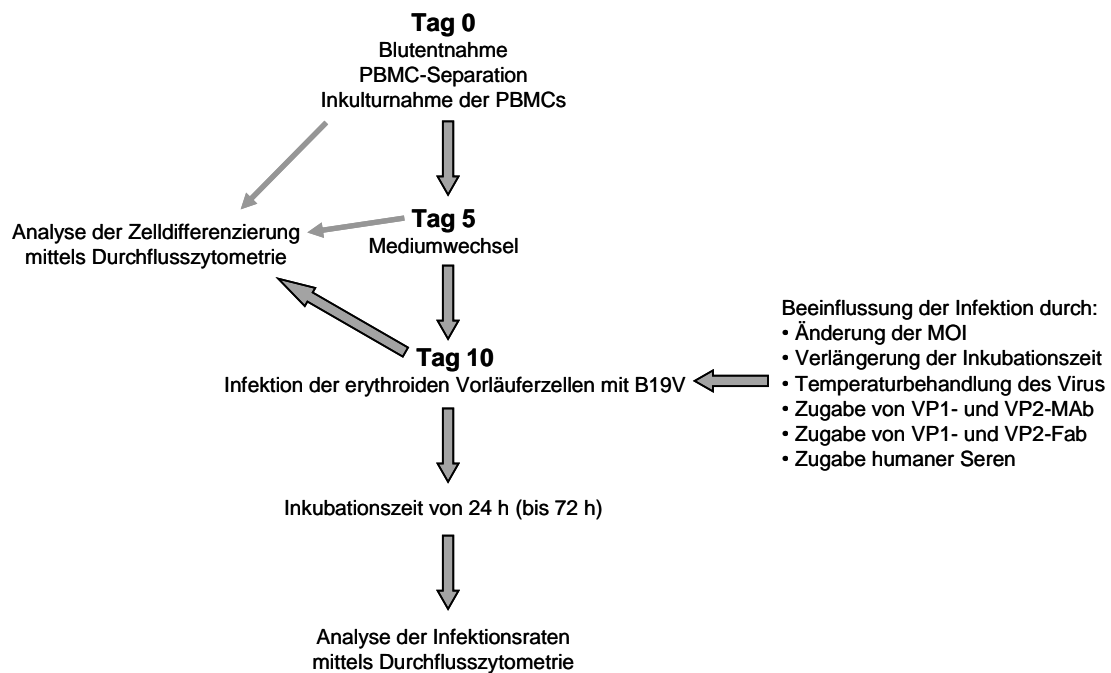


Abbildung 4.1: Flussdiagramm zur Versuchsdurchführung. Dargestellt ist der kurzgefasste Versuchsablauf von der Gewinnung der PBMCs aus Probandenblut bis zur Analyse der Infektionsraten im Durchflusszytometer. Dicke Pfeile symbolisieren Hauptschritte, dünne Pfeile sind vereinzelte Analysen.

4.2 Vorbemerkung zur Darstellungsweise der Messwerte

Durchflusszytometrisch wurde der prozentuale Anteil der Zellen gemessen, die mittels monoklonaler, fluoreszenzfarbstoffgekoppelter Antikörper positiv für das detektierte Antigen waren. Dies waren Oberflächenstrukturen zur Charakterisierung der Zelldifferenzierung oder das intrazelluläre, virale NS1-Protein als Nachweis einer B19V-infizierten Zelle. Jedes Einzelexperiment spiegelte die Analyse der Zellen einer Spenderperson wider. Da die Infektionsraten verschiedener Zellspender oder auch desselben Spenders zu verschiedenen Zeiten eine große Variabilität aufwiesen, wurden die absoluten Messwerte bei bestimmten Ergebnisdarstellungen zur Vergleichbarkeit auf den Messwert der unbeeinflussten MOI 1000 normiert, d.h. dieser als 100 % gesetzt. Diese relativen Infektionsraten wurden bei gleichem Versuchsaufbau mit identischen Proben bzw. Ansätzen zu einem Mittelwert zusammengefasst, der mit der Standardabweichung angegeben ist. Dieses Normierungsverfahren wurde bei allen Titrationsexperimenten mit Antikörpern und Seren angewendet. Die Titrationsexperimente der MOI wurden dagegen nicht normiert, um die Zellspender-abhängige Variabilität der Infektionsrate darzustellen.

4.3 Charakterisierung der Zelldifferenzierung

4.3.1 Zellzahl im Kulturverlauf

Insgesamt wurde Blut von sieben Spenderpersonen (Sp1–Sp7) zur Gewinnung der PBMCs verwendet. Das Blut dreier Probanden (Sp5–Sp7) wurde für Vorversuche eingesetzt und nicht in die Auswertungen einbezogen; die Infektionsexperimente wurden mit Blut der Probanden Sp1–Sp4 (Alter: 28–31 Jahre) durchgeführt. Zur Gewinnung der PBMCs wurden jeder Spenderperson zwischen 50 ml und 100 ml Vollblut pro Ansatz abgenommen. Im Mittel konnten daraus $1,3 \times 10^6$ PBMC/ml separiert werden. In Abbildung 4.2 sind exemplarisch die Zellzahlen der Spender Sp1 und Sp2 im zeitlichen Verlauf dargestellt.

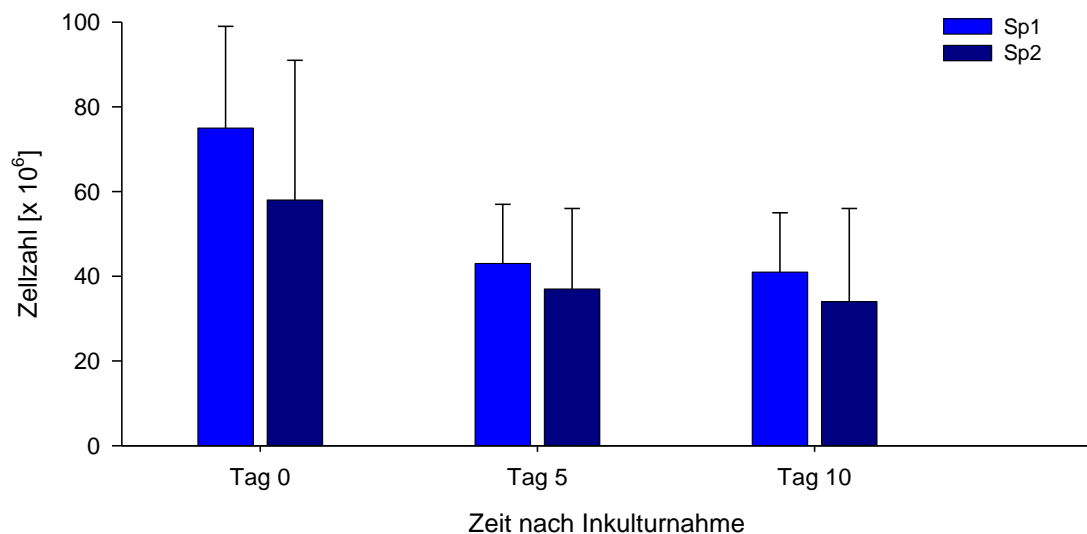


Abbildung 4.2: Zellzahlen im Kulturverlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gesamtzellzahlen der Spender Sp1 und Sp2 aus jeweils zehn Ansätzen. Ausgangswert jedes Ansatzes war die an Tag 0 in Kultur genommene Zellzahl. Die Messungen erfolgten mit der Neubauer Zählkammer.

Es war generell eine 30–40 %ige Abnahme der Gesamtzellzahl am fünften Kultivierungstag zu verzeichnen. An Tag 10 lagen die Zellzahlen ähnlich hoch wie an Tag 5. Hinweise auf eine bakterielle Kontamination traten während der gesamten Experimente nie auf.

4.3.2 Zelldifferenzierung im Kulturverlauf

Für die Analyse der Zelldifferenzierung wurden an Tag 0, Tag 5 und Tag 10 die Zelloberflächenmarker CD34, CD36, CD71, Blutgruppen-P-Antigen und Glycophorin A durchflusszytometrisch analysiert und ihr Anteil an der gesamten Zellpopulation bestimmt. Für diese Untersuchung wurden Zellen der beiden Spender Sp2 und Sp3 eingesetzt (Abbildung 4.3).

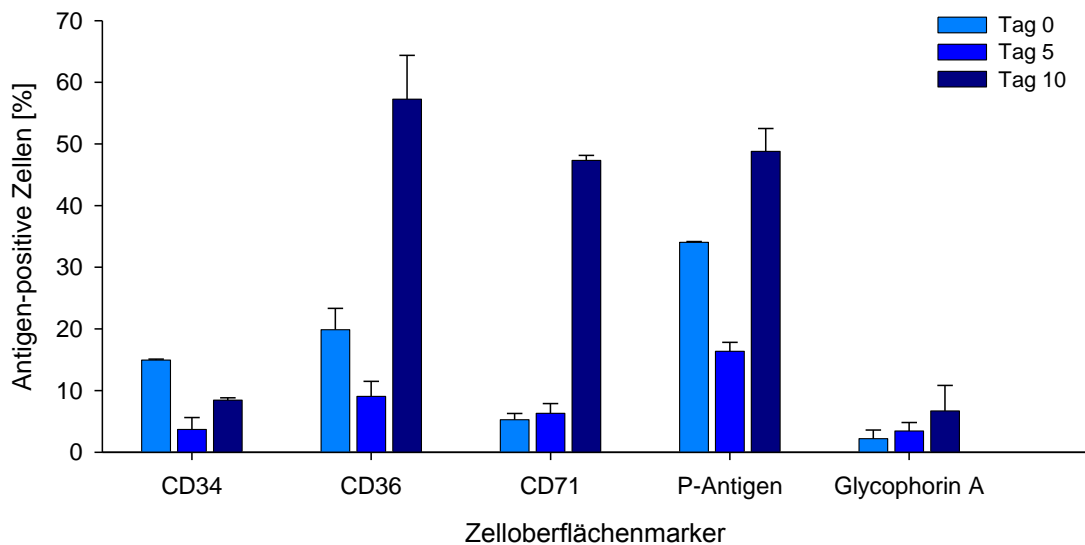


Abbildung 4.3: Zelldifferenzierung im Kulturverlauf. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Zellen, die positiv für das jeweilige Oberflächenantigen waren. Analysiert wurden zwei parallel kultivierte PBMC-Ansätze der Zellspender Sp2 und Sp3 an Tag 0, Tag 5 und Tag 10. Es sind die Mittelwerte aus beiden Ansätzen angegeben.

Die Spender Sp2 und Sp3 wiesen bei Inkulturnahme (Tag 0) mit ca. 15,0 % einen ähnlichen Ausgangsanteil an CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen im peripheren Blut auf. Nach fünf Tagen war ein deutlicher Rückgang auf 3,7 % zu verzeichnen, an Tag 10 ein Anstieg auf 8,5 %. Der Anteil der CD36⁺ erythroiden Vorläuferzellen lag an Tag 0 bei 20,0 % und fiel fünf Tage später auf 9,1 %. Am zehnten Tag war mit 57,3 % ein deutlicher Wiederanstieg zu verzeichnen. Der Transferrinrezeptor CD71 wurde sowohl an Tag 0 wie an Tag 5 auf nur 5,3 % bzw. 6,3 % der Zellen nachgewiesen, an Tag 10 lag der Wert bei 47,3 %. Blutgruppen-P-Antigen-positive Zellen wiesen einen ähnlichen Verlauf wie die CD36-positiven Zellen auf. Vom höheren Ausgangsniveau von 34,1 % fiel der Wert an Tag 5 auf 16,4 % ab. An Tag 10 waren die Werte wieder deutlich auf 48,8 % angestiegen, blieben aber hinter den Werten für CD36⁺ zurück. Das Glycophorin A zeigte mit einem durchschnittlichen Anteil von 2,2 % positiver Zellen bei Inkulturnahme und 6,7 % an Tag 10 die insgesamt schwächste Ausprägung aller analysierten Parameter.

4.4 Infektion der CD36⁺ Zellen mit Parvovirus B19

An Tag 10 nach Inkulturnahme wurden die Zellen mit definierten Mengen von B19V infiziert. Je Napf wurden 5×10^5 Zellen/ml eingesetzt und bei 37°C zwischen 24 h und 72 h, je nach Versuchsaufbau, inkubiert. Danach wurden die Zellen durchflusszytometrisch hinsichtlich des intrazellulären, viralen NS1-Proteins – das mit dem monoklonalen, fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörper MAb 1424 detektiert wurde – analysiert. Der Anteil der NS1-positiven Zellen wurde prozentual zur Population der CD36⁺ Zellen berechnet.

4.4.1 Einfluss der Zelldifferenzierung auf die Infizierbarkeit

Es wurde ein Zellansatz der Spenderperson Sp2 auf die Expression von CD36 und Blutgruppen-P-Antigen sowie die Infizierbarkeit getestet. Die Infektion erfolgte an Tag 10 mit der MOI 1000, gefolgt von der durchflusszytometrischen Analyse nach 24-stündiger Inkubation. Die nicht infizierten (A) und infizierten (B) Proben wurden in einem sequenziellen Färbeprozess zuerst oberflächenmarkiert und anschließend mit NS1-spezifischem MAb intrazellulär gefärbt (Abbildung 4.4).

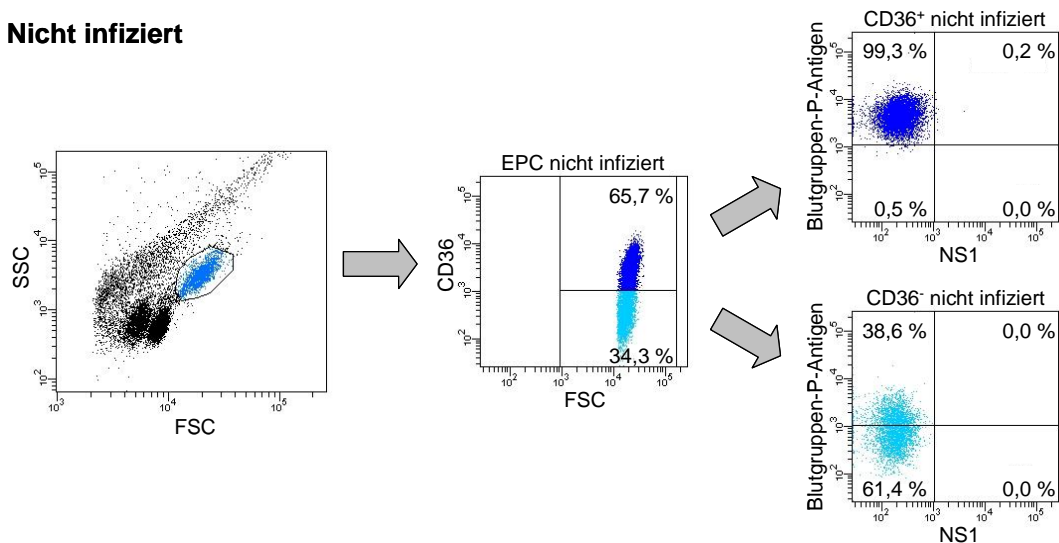
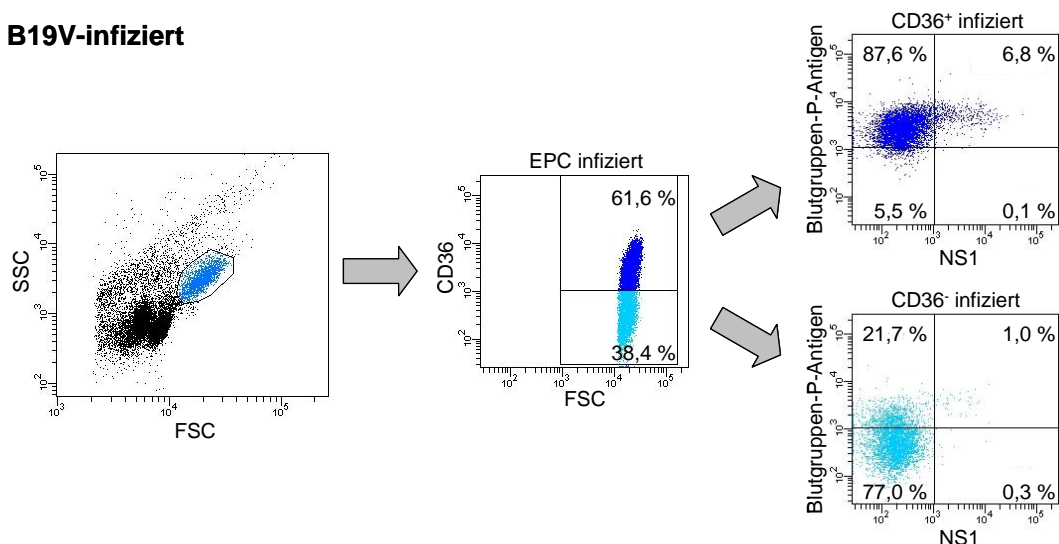
A Nicht infiziert**B B19V-infiziert**

Abbildung 4.4: Durchflusszytometrische Analyse der Zellpopulationen des Spenders Sp2 und ihrer Infizierbarkeit. **A:** Nicht infizierte Zellen. **B:** B19V-infizierte Zellen. Gezeigt wird die prozentuale Verteilung der Zellpopulationen eines Kulturansatzes des Spenders Sp2 anhand ihrer Expression der Oberflächenmarker CD36 und Blutgruppen-P-Antigen. Die Infektion erfolgte mit 5×10^5 Zellen/Napf und der MOI 1000; die Inkubationszeit betrug 24 h bei 37°C. Mittels fluoreszenzfarbstoffgekoppelten, monoklonalen Antikörpern wurden extrazellulär die Zelloberflächenproteine CD36 und Blutgruppen-P-Antigen sowie intrazellulär das virale NS1-Protein durchflusszytometrisch detektiert. EPC: erythroid progenitor cells; FSC: forward scatter; SSC: side scatter.

Betrachtet man die abgrenzbare Population der erythroiden Vorläuferzellen (*erythroid progenitor cells*, EPC), so zeigte die Oberflächenmarkierung einen Anteil von ca. 66 % CD36⁺ Zellen und 33 % CD36⁻ Zellen. Jede dieser Subpopulationen wurde nun bzgl. des Vorhandenseins von Blutgruppen-P-Antigen und intrazellulärem NS1-Protein untersucht. Das Blutgruppen-P-Antigen war nahezu vollständig auf allen CD36⁺ Zellen zu finden, wohingegen CD36⁻ Zellen nur zu 38,6 % (A) bzw. 22,7 % (B) Blutgruppen-

P-Antigen-positiv waren. In den nicht infizierten Zellen (A) war kein NS1-Protein zu detektieren. Bei den infizierten Zellen (B) waren in der Subpopulation der CD36⁺ Zellen 6,8 % der Zellen doppelt-positiv für Blutgruppen-P-Antigen und NS1-Protein, während dies nur bei 0,1 % der Blutgruppen-P-Antigen-negativen Zellen der Fall war. Bei den CD36⁻ Zellen konnte mit 1,0 % noch ein kleiner Anteil NS1-positiver Zellen nachgewiesen werden, verbunden mit dem Vorhandensein von Blutgruppen-P-Antigen.

Es kann gefolgert werden, dass Blutgruppen-P-Antigen-negative Zellen nicht mit B19V infiziert werden; es erfolgte keine NS1-Produktion. Ebenso war die Positivität für CD36 eine wesentliche Voraussetzung, die aber nur in ca. 2/3 der durchflusszytometrisch darstellbaren EPC-Population vorhanden war.

4.4.2 Infektion mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen

Zuerst wurde der Einfluss des B19V-Serostatus der Zellspender mit der MOI 1000 überprüft. Dazu wurden die Infektionsraten aus mehreren Experimenten gegenübergestellt, die mit Zellen der drei Hauptspenderpersonen (Sp1, Sp2, Sp3) durchgeführt wurden (Abbildung 4.5). Die Spender Sp1 und Sp2 waren seronegativ für Parvovirus B19, Sp3 dagegen seropositiv.

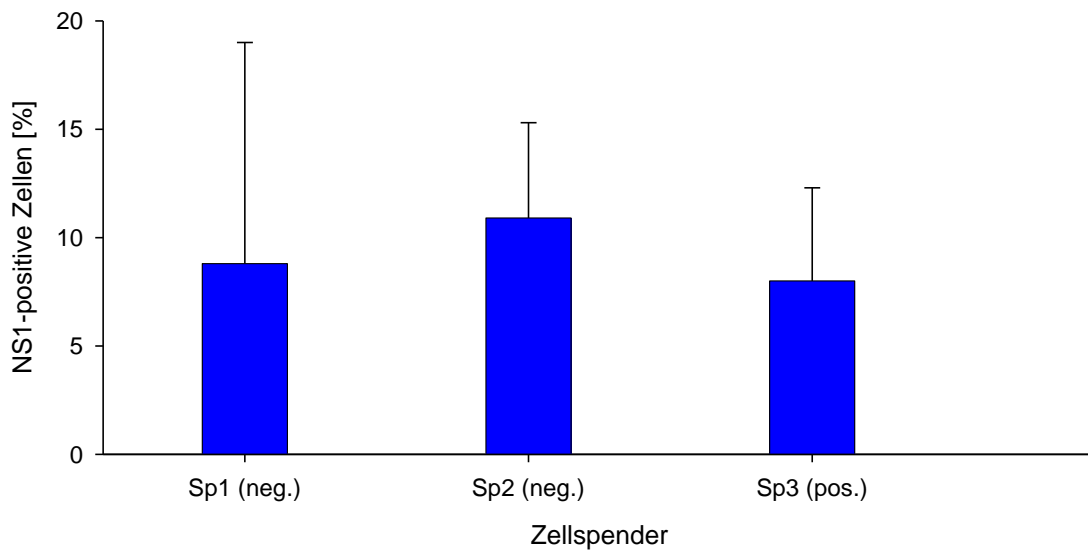


Abbildung 4.5: Einfluss des B19V-Serostatus auf die Infektionsrate. Dargestellt sind die durchschnittlichen Infektionsraten bei Einsatz von Zellen der seronegativen (neg.) Spender Sp1 und Sp2 sowie des seropositiven (pos.) Spenders Sp3. Die Infektion erfolgte nach dem Grundschem (siehe 3.3.1). Nach der Inkubation wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf das intrazelluläre, virale NS1-Protein untersucht (siehe 3.4.3). Von Sp1 wurden die Messwerte aus vier Experimenten, von Sp2 aus fünf Experimenten und von Sp3 aus drei Experimenten verwendet.

Die durchschnittliche Infektionsrate lag für Sp1 und Sp3 mit 8,8 % bzw. 8,0 % auf ähnlichem Niveau. Mit 10,9 % war die durchschnittliche Infektionsrate bei Sp2 etwas höher. Der Vergleich zwischen den seropositiven und -negativen Spendern zeigte keine wesentlichen Unterschiede in der Infizierbarkeit der Zellen; in allen Versuchen war die breite Variation der Infektionsrate vorhanden. Daraus wurde geschlossen, dass der Serostatus keinen Einfluss auf die Infizierbarkeit hat.

In weiteren Versuchen wurden unterschiedliche Viruskonzentrationen für die Infektion eingesetzt. Ausgehend von der MOI 1000 wurde das Blutplasma BP07 sequenziell verdünnt und mit MOIs von 100, 10, 1 und 0,1 zur Infektion verwendet. Die infizierten Zellen wurden für 24 h bei 37°C inkubiert. Abbildung 4.6 zeigt das Ergebnis von zwölf Titrationsexperimenten mit Zellen der vier Spender Sp1 bis Sp4. Auf die Normierung der Messwerte im Bezug zur MOI 1000 wurde verzichtet, um die Spannweite der Infektionsrate darzustellen.

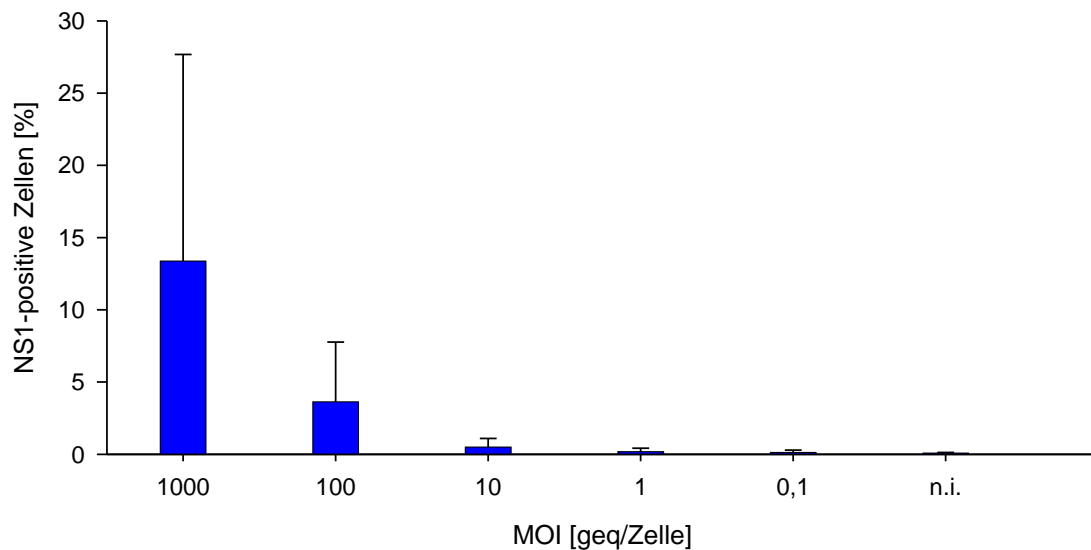


Abbildung 4.6: Infektion mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen (MOI). Dargestellt sind die prozentualen Anteile der NS1-positiven Zellen, bezogen auf die Population der CD36⁺ Zellen. Die Infektion erfolgte nach dem Grundschem (siehe 3.3.1). Nach der Inkubation wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf das intrazelluläre, virale NS1-Protein untersucht (siehe 3.4.3). Es sind die Mittelwerte aus zwölf Experimenten mit Zellen mehrerer Spenderpersonen angegeben; n.i.: nicht infizierte Kontrollen.

Bei MOI 1000 wurden durchschnittlich 13,4 % der CD36⁺ Zellen infiziert. Es zeigte sich aber sowohl bei verschiedenen Zellspendern als auch bei wiederholten Ansätzen mit Zellen derselben Spender eine große Spannweite der Infektionsrate von 3,1 % bis 45,1 %. Infektionen mit der MOI 100 ergaben eine Infektionsrate von 3,6 % der CD36⁺ Zellen. Die Infektionsrate für MOI 10 lag unterhalb 2,0 %, ebenso die der MOI 1 und MOI 0,1. Die Negativkontrolle betrug gemittelt 0,1 %.

4.4.3 Infektion mit unterschiedlichen Inkubationszeiten

In weiteren Ansätzen wurde untersucht, ob die Inkubationszeit die Infektionsrate beeinflusst. Nach bekanntem Schema wurden MOIs von 1000 bis 0,1 geq/Zelle für die Infektion eingesetzt und die Zellen sowie Negativkontrollen für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert (Abbildung 4.7).

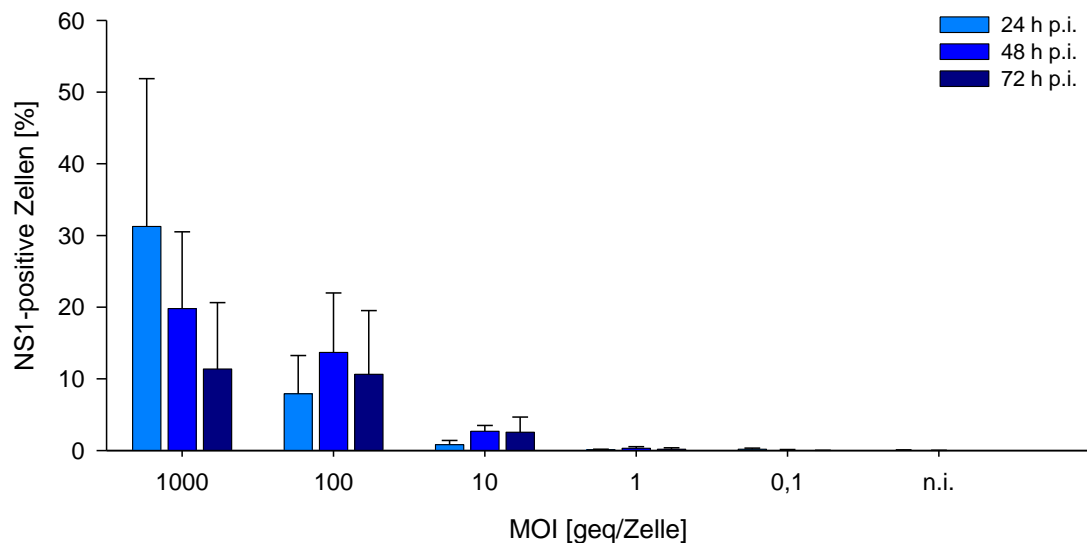


Abbildung 4.7: Infektionsverlauf über 24–72 Stunden. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der NS1-positiven Zellen, bezogen auf die Population der CD36⁺ Zellen. Die Infektion erfolgte nach dem Grundschemata (siehe 3.3.1). Nach der Inkubation wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf das intrazelluläre, virale NS1-Protein untersucht (siehe 3.4.3). Es sind die Mittelwerte aus drei Experimenten angegeben; n.i.: nicht infizierte Kontrollen; p.i.: *post infectionem* (Stunden nach der Infektion).

Bei Infektion mit MOI 1000 und 24-stündiger Inkubation betrug der Anteil der NS1-positiven Zellen 31,3 %. Eine längere Inkubationszeit führte zu einem abnehmenden Anteil an infizierten Zellen. Die Infektionsrate für MOI 100 wies bei 48 h ein Maximum, verglichen mit den beiden anderen Zeitpunkten, auf. Bei niedrigeren MOIs (10 und 1) zeigte sich kein relevanter Unterschied zwischen den Infektionsraten und den Negativkontrollen mehr.

4.4.4 Einfluss der Temperaturbehandlung auf die B19V-Infektiosität

Inwieweit sich Parvovirus-B19-Virionen durch Temperaturbehandlung hinsichtlich ihrer Infektiosität inaktivieren lassen, war Gegenstand der folgenden Experimente. Dafür wurde das aliquotierte B19V-haltige Blutplasma BP07 im Heizblock für jeweils 5 min bei 40°C, 56°C, 60°C und 80°C sowie 30 min bei 56°C erhitzt und danach auf Eis abgekühlt (siehe 3.3.2). Die MOI 1000 wurde für alle Infektionen eingesetzt. In Abbildung 4.8 sind die Ergebnisse aus drei verschiedenen Experimenten zusammengefasst. Die Normierung der Messwerte wurde angewendet und der

Mittelwert der nicht temperaturbehandelten B19V-Ansätze (Raumtemperatur, RT) als 100 % gesetzt.

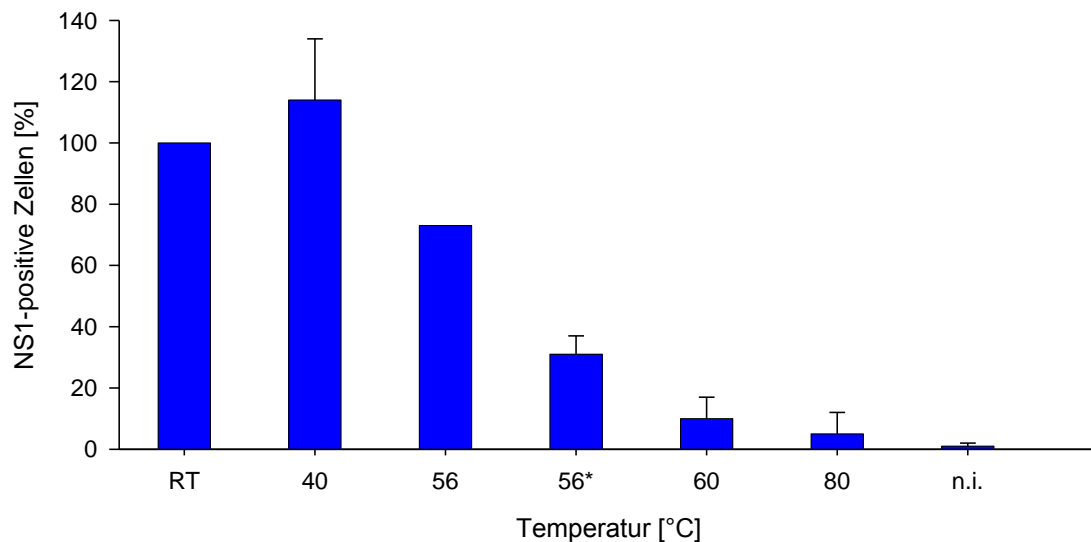


Abbildung 4.8: Einfluss der Temperaturbehandlung auf die B19V-Infektiosität. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der NS1-positiven Zellen, bezogen auf die Population der CD36⁺ Zellen. Parvovirus B19 wurde vor der Infektion temperaturbehandelt: Aliquots des B19V-haltigen Blutplasmas BP07 wurden 5 min bzw. 30 min (56*) bei angegebenen Temperaturen erhitzt, auf Eis abgekühlt und auf MOI 1000 verdünnt. Die Infektion erfolgte nach dem Grundschemata (siehe 3.3.1). Nach der Inkubation wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf das intrazelluläre, virale NS1-Protein untersucht (siehe 3.4.3). Es sind die Mittelwerte aus drei Experimenten angegeben, wovon die Temperaturstufe 56°C (5 min) in einem, 56°C (30 min) in zwei und die übrigen Stufen in allen drei Experimenten eingesetzt wurden. Die Infektionsraten der Raumtemperatur-Ansätze (RT) wurden jeweils als 100 % gesetzt und die korrespondierenden Messwerte darauf normiert; n.i.: nicht infizierte Kontrollen.

Die Infektionsrate lag bei 40°C um 14,3 % höher als die der nicht erhitzten Proben. Bei 56°C war nach 5-minütiger Temperaturbehandlung eine Reduktion der Infektionsrate um 27,1 % im Vergleich zu RT zu verzeichnen; nach 30-minütiger Behandlung betrug sie bereits durchschnittlich 68,7 %. Bei 60°C-Behandlung war die Infektionsrate weiter reduziert und lag im Mittel 90,4 % niedriger als bei RT. Bei 80°C waren nur noch 4,5 % der eingesetzten Zellen infiziert worden.

In einem zweiten Experiment wurde ausgehend von der MOI 100000 eine sequenzielle Verdünnungsreihe bis MOI 0,1 für die Infektion eingesetzt, bei der das B19V-haltige Blutplasma BP07 zuvor für 30 min bei 60°C inkubiert wurde (siehe 3.3.2) (Abbildung 4.9). In Vorversuchen zeigte sich, dass es bei Raumtemperatur-Ansätzen mit der MOI 50000 zu einer Gel-artigen Konsistenz der Zellsuspension kam, was die Analyse

verhinderte. Die 60°C-behandelten Ansätze zeigten dieses Phänomen nicht. Wegen des hohen Proteingehalts des Blutplasmas kam es bei der probatorischen 80°C-Behandlung zur Proteinausfällung und damit Unbrauchbarkeit, weshalb diese Temperaturstufe nicht zusätzlich getestet werden konnte. Bei den kleineren Aliquots im vorherigen Experiment war dies noch nicht aufgetreten. In Abwandlung des herkömmlichen Infektionsschemas wurde auf die Kälteinkubation (4°C, 2 h) verzichtet und die Inkubationszeit auf 48 h verlängert.

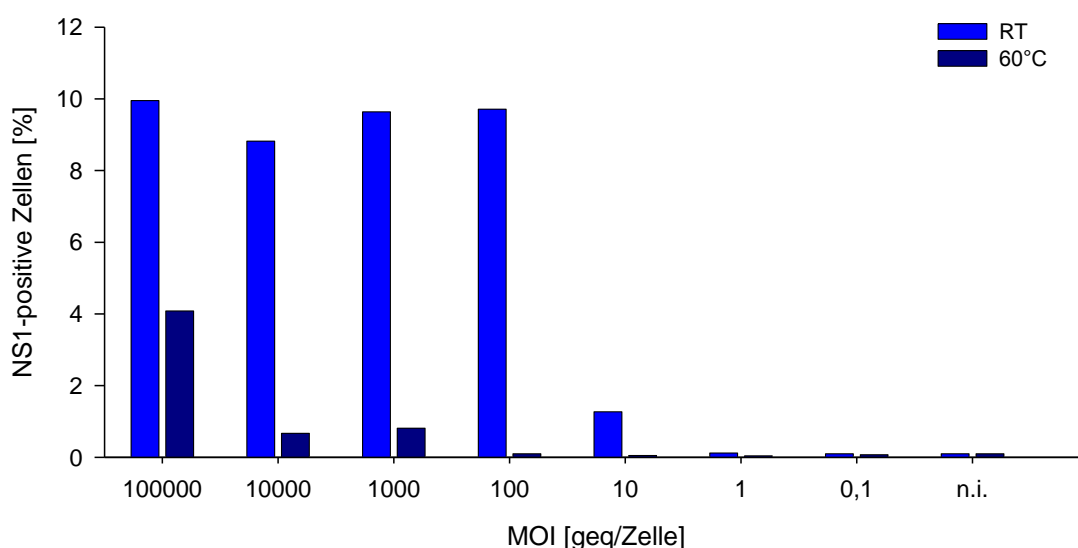


Abbildung 4.9: Infektion mit temperaturbehandeltem Virus und verschiedenen MOI-Stufen. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der NS1-positiven Zellen, bezogen auf die Population der CD36⁺ Zellen aus einem Einzelexperiment. Aliquots des B19V-haltigen Blutplasmas BP07 wurden für 30 min bei 60°C erhitzt und daraus sequenziell die MOI-Stufen von 100000 bis 0,1 geq/Zelle erstellt. Parallel wurde ein entsprechender Ansatz mit raumtemperaturbehandeltem Virus (RT) erstellt. Der Infektionsansatz erfolgte abweichend vom bekannten Schema (3.3.1) gleich in 1 ml Gesamtvolumen ohne vorherige Kälteinkubation. Nach der Inkubation (48 h) wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf das intrazelluläre, virale NS1-Protein untersucht (siehe 3.4.3). Eine Normierung der Messwerte erfolgte nicht; n.i.: nicht infizierte Kontrollen.

Die Raumtemperatur-Infektionsraten bei höheren und mittleren Viruskonzentrationen (MOI 100000 bis MOI 100) lagen auf annähernd gleichem Niveau von ca. 10,0 %. Bei der MOI 10 fiel der Prozentsatz infizierter Zellen auf 1,3 %. Ab der MOI 1 lagen die Werte im Bereich der Negativkontrolle. Bei Behandlung des B19V-haltigen Blutplasmas BP07 mit 60°C erreichte man bei hohen Virusmengen (MOI 100000) nur mehr eine Infektionsrate von 4,1 %; dies entsprach einer Reduktion um 59,0 % gegenüber dem Raumtemperatur-Wert. Wurden niedrigere Viruskonzentrationen

($\text{MOI} \leq 10000$) zur Infektion eingesetzt, lagen alle Infektionsraten unterhalb 1,0 %, und ab der MOI 100 auf Höhe der Negativkontrolle. Die bei Einsatz einer MOI 1000 durch thermische Behandlung erreichte Reduktion der Infektionsrate lag mit 91,6 % auf gleichem Niveau, wie bereits in Abbildung 4.8 für dieselbe Temperaturstufe von 60°C gezeigt wurde. Sie war somit in diesen Experimenten unbeeinflusst vom Ausgangsvolumen (300 µl bzw. 1 ml) und der Inkubationszeit (24 h bzw. 48 h). Zu berücksichtigen ist allerdings, dass mit zunehmender Inkubationszeit auch Nachkommenviren in der Kultur vorhanden sind, was bereits in Abbildung 4.7 dargestellt wurde.

4.5 B19V-Neutralisation mit monoklonalen VP1-, VP2- und NS1-spezifischen Antikörpern

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung der Neutralisationskapazität der humanen, monoklonalen Antikörper MAb 860-55, MAb 1418 und MAb 1424 (siehe 2.3.2). Die Infektionsexperimente wurden nach bekanntem Grundschema (siehe 3.3.1) mit 100 µl Zellsuspension ($= 5 \times 10^5$ Zellen), 100 µl Virussuspension ($= 5 \times 10^8$ geq = MOI 1000) und 100 µl Antikörpersuspension je Napf durchgeführt. Aliquots der MAbs wurden sequenziell zu 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,01 µg/ml verdünnt. Die Inkubationszeit der infizierten Zellen betrug 24 h; es wurden mehrfache Ansätze mit mehreren Zellspendern durchgeführt. Die Messwerte wurden auf den jeweiligen Wert der MOI 1000 ohne Antikörperzugabe normiert (= 100 %) und in Abbildung 4.10 dargestellt. In Tabelle 4.1 ist die prozentuale Inhibition der Infektionsrate für jede Verdünnungsstufe von MAb 860-55 und MAb 1418 aufgeführt.

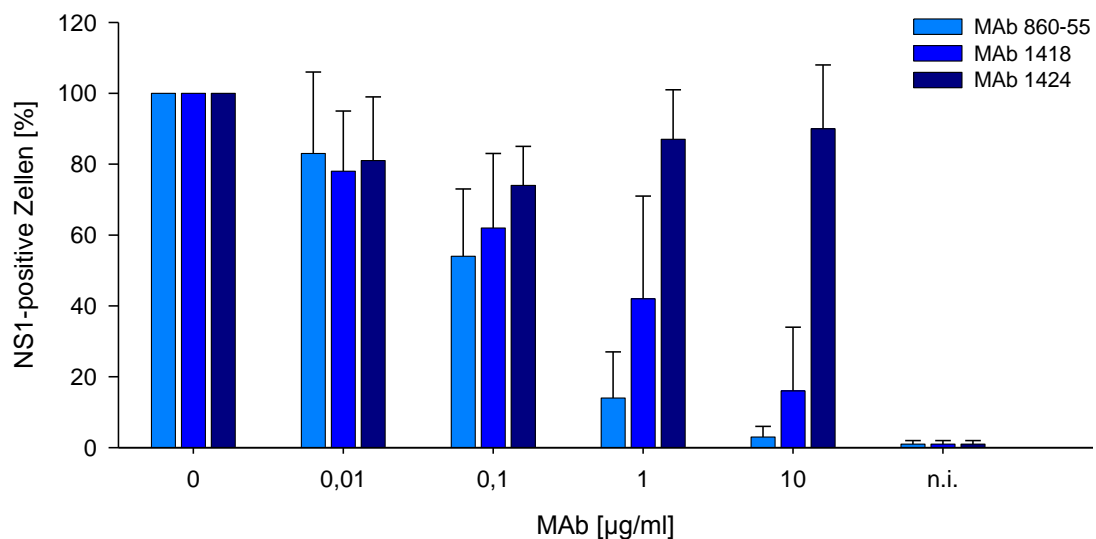


Abbildung 4.10: Infektion unter Zugabe der monoklonalen Antikörper MAb 860-55, MAb 1418 und MAb 1424. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der NS1-positiven Zellen, bezogen auf die Population der CD36⁺ Zellen. Die Infektion erfolgte nach dem Grundschem (siehe 3.3.1); zu den Infektionsansätzen wurden 100 µl der jeweiligen Antikörperverdünnung gegeben. Nach der Inkubation wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf das intrazelluläre, virale NS1-Protein untersucht (siehe 3.4.3). Es sind die Mittelwerte aus 20 Experimenten mit MAb 860-55, elf Experimenten mit MAb 1418 und vier Experimenten mit MAb 1424 angegeben. Die Infektionsraten der antikörperfreien Ansätze (0 µg/ml) wurden jeweils als 100 % gesetzt und die korrespondierenden Messwerte darauf normiert; n.i.: nicht infizierte Kontrollen.

Antikörperkonzentration [µg/ml]	Inhibition der Infektion [%]	
	MAb 860-55	MAb 1418
0,01	16,8 (± 23,3)	22,0 (± 17,3)
0,1	46,2 (± 18,8)	38,4 (± 21,2)
1	85,5 (± 13,1)	57,8 (± 29,0)
10	96,6 (± 2,9)	83,7 (± 18,0)

Tabelle 4.1: Prozentuale Inhibition der Infektion mit MAb 860-55 und MAb 1418. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, errechnet aus den prozentualen Differenzen der Infektionsrate zwischen MOI 1000 ohne Antikörperzugabe und der jeweiligen Antikörperverdünnungsstufe.

Bei steigender Menge von MAb 860-55 zeigte sich ein Rückgang der Infektionsrate, mit einer 96,6 %igen Inhibition bei Einsatz von 10 µg/ml. Die Neutralisationskapazität des MAb 1418 war vergleichsweise schwächer; bei Einsatz von 10 µg/ml wurde ein Wert von 83,7 % erreicht. Der NS1-spezifische Antikörper MAb 1424 wurde parallel zu den

Ansätzen getestet und zeigte keine Anzeichen für eine infektionsinhibierende Wirkung. Da bekannt ist, dass das NS1-Protein nicht am strukturellen Aufbau des Virions beteiligt ist, diente der MAb 1424 als Negativkontrolle.

4.6 B19V-Neutralisation mit Fab-Fragmenten der monoklonalen Antikörper

Zusätzlich zu den vollständigen IgG-Molekülen wurden Fab-Fragmente zur Hemmung der B19V-Infektiosität eingesetzt. Aus den MAbs wurden durch Papain-Spaltung die Fab-Fragmente hergestellt (siehe 3.2.2). Auf die Testung der Fab-Fragmente von MAb 1424 wurde wegen der fehlenden Neutralisationskapazität verzichtet. Die beiden monoklonalen Antikörper MAb 860-55, MAb 1418 als auch deren Fab-Fragmente wurden in Parallelexperimenten eingesetzt (Abbildung 4.11, Tabelle 4.2).

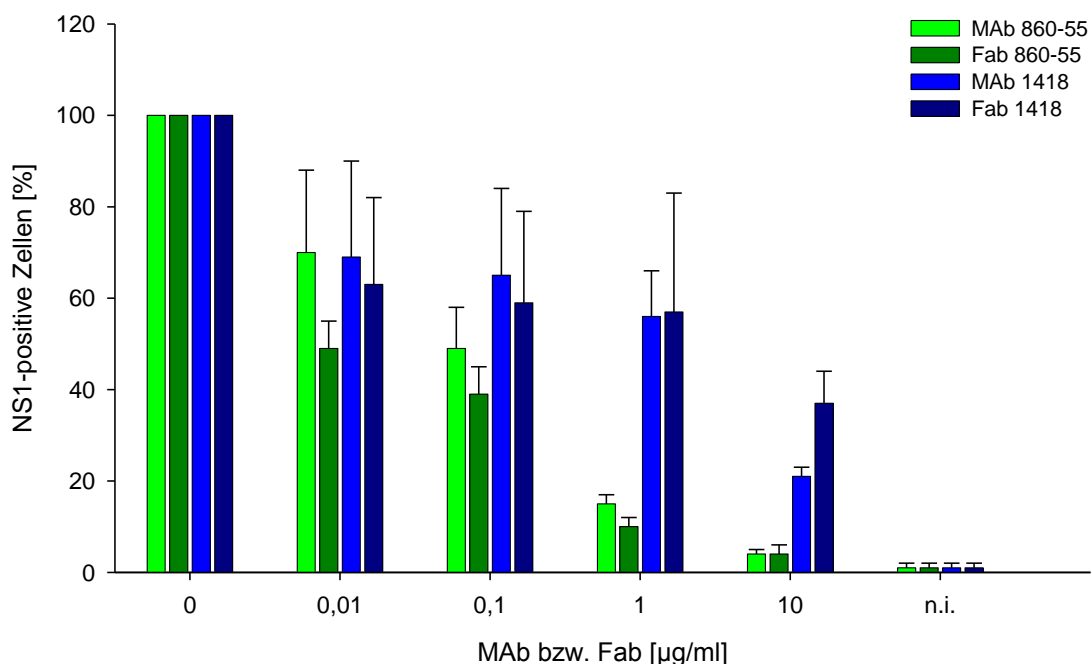


Abbildung 4.11: Infektion unter Zugabe der monoklonalen Antikörper MAb 860-55, MAb 1418 und ihrer Fab-Fragmente. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der NS1-positiven Zellen, bezogen auf die Population der CD36⁺ Zellen. Die Infektion erfolgte nach dem Grundschem (siehe 3.3.1); zu den Infektionsansätzen wurden 100 µl der jeweiligen Antikörperverdünnung gegeben. Nach der Inkubation wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf das intrazelluläre, virale NS1-Protein untersucht (siehe 3.4.3). Es sind die Mittelwerte aus fünf Experimenten angegeben. Die Infektionsraten der antikörperfreien Ansätze (0 µg/ml) wurden jeweils als 100 % gesetzt und die korrespondierenden Messwerte darauf normiert; n.i.: nicht infizierte Kontrollen.

Inhibitorkonzentration [µg/ml]	Inhibition der Infektion [%]			
	MAb 860-55	Fab 860-55	MAb 1418	Fab 1418
0,01	29,8 (± 18,2)	50,9 (± 5,8)	30,8 (± 21,5)	36,7 (± 19,0)
0,1	51,4 (± 9,4)	60,7 (± 6,4)	35,4 (± 19,0)	40,6 (± 20,2)
1	84,9 (± 1,9)	90,5 (± 1,7)	43,9 (± 9,6)	42,5 (± 25,8)
10	96,0 (± 0,7)	95,5 (± 1,7)	79,4 (± 1,7)	63,0 (± 7,0)

Tabelle 4.2: Prozentuale Inhibition der Infektion mit MAb 860-55, MAb 1418 und ihren Fab-Fragmenten. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, errechnet aus den prozentualen Differenzen der Infektionsrate zwischen MOI 1000 ohne Inhibitorzugabe und der jeweiligen Inhibitorverdünnungsstufe.

Sowohl bei den Fab-Fragmenten als auch den vollständigen IgG-Molekülen von MAb 860-55 und MAb 1418 war mit steigender Konzentration eine Reduktion der Infektionsrate festzustellen. Im Vergleich zum MAb 860-55, der eine Inhibition der B19V-Infektiosität von über 90 % bei 10 µg/ml erreichte, war der MAb 1418 schwächer inhibierend (ca. 80 %). Dies deckte sich mit dem vorangegangenen Experiment (Abbildung 4.10). Vergleicht man die korrespondierenden MAb/Fab-Paare, so zeigte sich der Fab 860-55 – bis auf die Stufe 10 µg/ml – stärker inhibierend als der intakte MAb 860-55. Dieser Unterschied war bei MAb/Fab 1418 nicht so deutlich ausgeprägt, wo die Stufe mit gleicher Inhibitionsstärke bei 1 µg/ml erreicht war und bei 10 µg/ml der intakte MAb 1418 stärker inhibierend war. Daraus ergibt sich im direkten Vergleich der beiden Fab-Fragmente die inhibitorische Überlegenheit des Fab 860-55.

4.6.1 Berechnung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) der MAbs und ihrer Fab-Fragmente

Die mittlere inhibitorische Konzentration (*half maximal inhibitory concentration*, IC₅₀) ist die Konzentration einer Substanz (hier MAbs und Fab-Fragmente als Inhibitoren), mit der die halbmaximale Inhibition einer Reaktion erreicht werden kann. Durch den Vergleich der beiden MAb 860-55 und MAb 1418 sowie ihrer korrespondierenden Fab-Fragmente wurden die jeweiligen inhibitorischen Stärken berechnet (Abbildung 4.12, Tabelle 4.3); es wurden dafür die Messwerte aus Abbildung 4.11 verwendet. Von den normierten Messwerten wurde der Wert der jeweiligen Negativkontrolle abgezogen.

Die Berechnung erfolgte mit dem Modus *Inhibitor/Enzymkinetik* des Programms GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, USA) und wurde für die Inhibitorkonzentration in $\mu\text{g/ml}$ sowie mol/l durchgeführt. Für die Berechnung in mol/l wurde die Masse eines IgG-Moleküls mit 150 kDa und die eines Fab-Fragments mit 50 kDa angesetzt (vgl. Abbildung 3.1) sowie die Konzentration der Inhibitoren in mol/l für jede eingesetzte Verdünnungsstufe ermittelt. Es sollte mit dieser zusätzlichen Auswertung überprüft werden, ob sich Unterschiede in der ermittelten IC_{50} ergeben, da aufgrund der Masse des Fc-Teils (50 kDa) des intakten MABs die Anzahl der antigenbindenden Fab-Teile in den MAB- bzw. Fab-Suspensionen differierte.

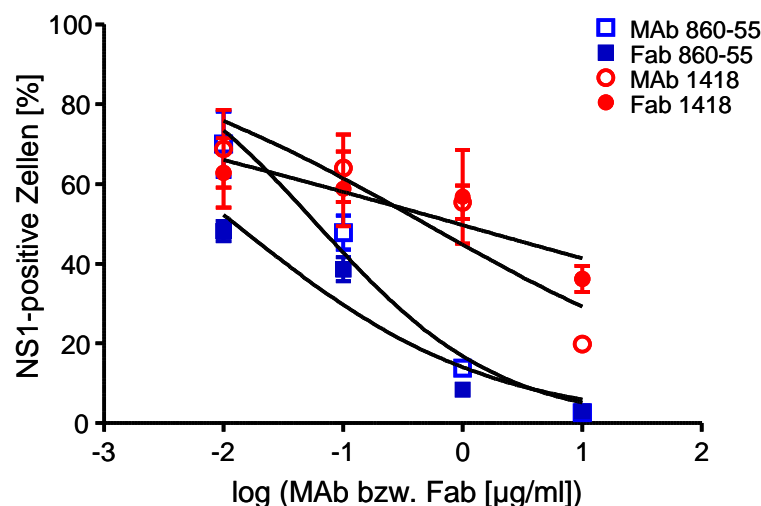


Abbildung 4.12: Neutralisationskurven der Inhibitoren MAb 860-55, MAb 1418 und ihrer Fab-Fragmente. Die normierten Infektionsraten wurden um den jeweiligen Wert der nicht infizierten Kontrolle bereinigt und gegen eine logarithmische Skala der Inhibitorkonzentration aufgetragen. Aus den einzelnen Messpunkten wurden vier Kurven berechnet, die den neutralisierenden Effekt jedes Inhibitors beschreiben.

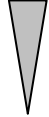
Inhibitor	B19V-Spezifität	IC ₅₀ [µg/ml]	IC ₅₀ [mol/l]	Neutralisationskapazität
Fab 860-55	VP2	0,01	2,5 x 10 ⁻¹⁰	hoch
MAB 860-55	VP2	0,06	3,8 x 10 ⁻¹⁰	
MAB 1418	VP1	0,49	3,1 x 10 ⁻⁹	
Fab 1418	VP1	0,92	1,8 x 10 ⁻⁸	niedrig

Tabelle 4.3: Neutralisationskapazität der vier Inhibitoren MAB 860-55, MAB 1418 und ihrer Fab-Fragmente. Ausgehend von Abbildung 4.12 wurde die mittlere inhibitorische Konzentration IC₅₀ (µg/ml und mol/l) für jeden Inhibitor berechnet und nach aufsteigender Konzentration geordnet, was einer absteigenden Neutralisationskapazität entspricht.

Um eine halb maximale Inhibition der Infektion zu erreichen, waren im Vergleich deutlich geringere Konzentrationen von VP2-spezifischem MAB bzw. Fab notwendig. Bezogen auf die Konzentration in µg/ml benötigten die VP1-spezifischen Immunglobuline eine ca. acht- (MAB) bzw. 92-fach (Fab) höhere Konzentration, um denselben Effekt zu erzielen. Fab 860-55 war sechsfach stärker als sein MAB, Fab 1418 dagegen nur halb so effektiv wie sein MAB. Betrachtet man die Konzentrationen in mol/l, so bleibt die Rangfolge bestehen. Dies gilt ebenso für die Relation MAB 860-55 zu MAB 1418 bzw. Fab 860-55 zu Fab 1418. Vergleicht man die korrespondierenden MAB/Fab-Paare, so imponieren die Fab-Fragmente nun aber weniger effektiv als ihre MABs.

4.7 B19V-Neutralisation mit humanen Seren

Nach den Infektionsexperimenten mit monoklonalen Antikörpern wurden humane, B19V-IgG-positive Seren getestet. Hiermit sollten die Bewertung der individuellen Neutralisationskapazität und ein Vergleich mit anderen Labormethoden (u.a. ELISA, Immunblot) erfolgen. Das Verfahren wurde erst mit Seren von gesunden Probanden getestet, anschließend wurden Seren von Patienten mit teils chronischer B19V-Virämie eingesetzt.

4.7.1 Seropositive und -negative Probanden

Von fünf Institutsmitarbeitern (Alter: 27–49 Jahre) mit bekanntem B19V-Serostatus wurden Serumproben gewonnen und der aktuelle B19V-IgG-Titer (Tabelle 4.4) sowie das B19V-Antikörperbindungsmuster verifiziert. Bei den vier seropositiven Probanden wurde das Serum in den Verdünnungsstufen 1:50, 1:100, 1:200 und 1:400 eingesetzt (Abbildung 4.13).

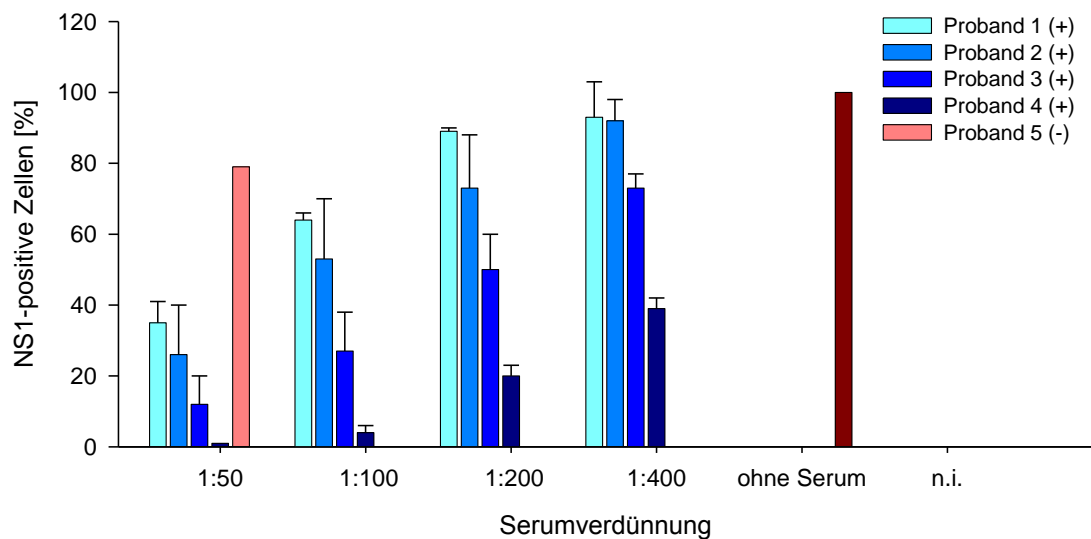


Abbildung 4.13: B19V-Neutralisationskapazität in Seren von seropositiven und -negativen Probanden. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der NS1-positiven Zellen, bezogen auf die Population der CD36⁺ Zellen. Die Infektion erfolgte nach dem Grundschem (siehe 3.3.1); zu den Infektionsansätzen wurden 100 µl der jeweiligen Serumverdünnung gegeben. Nach der Inkubation wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf das intrazelluläre, virale NS1-Protein untersucht (siehe 3.4.3). Die Probanden 1 bis 4 repräsentieren seropositive Personen (+), Proband 5 die seronegative Kontrollperson (-). Es sind die Mittelwerte aus zwei Experimenten angegeben. Das B19V-IgG-negative Serum liegt als Einzelmesswert vor. Die Infektionsraten der serumfreien Ansätze wurden jeweils als 100 % gesetzt und die korrespondierenden Messwerte darauf normiert. Die Werte der nicht infizierten Kontrollen (n.i.) lagen jeweils bei 0,01 % und kommen daher skalierungsbedingt nicht zur grafischen Darstellung.

Jeder Ansatz mit IgG-positivem Serum zeigte mit zunehmender Verdünnungsstufe eine zunehmende Zahl von infizierten, NS1-positiven Zellen. Bei Proband 1 lagen die Werte bei Verdünnung 1:200 und 1:400 auf ähnlichem Niveau. Hier, und auch bei Proband 2, zeigte sich bei Verdünnung 1:400 nahezu kein Neutralisationseffekt mehr. Das Serum von Proband 3 zeigte mit ca. 70 % infizierter Zellen bei Verdünnung 1:400 noch eine leichte Inhibition der Infektion. Das Probandenserum 4 zeigte eine deutlich stärkere Neutralisation, die bei Verdünnung 1:400 mit ca. 40 % infizierter Zellen dem Niveau

des Probandenserums 1 bei Verdünnung 1:50 entsprach. Zwar zeigte Proband 5 (seronegative Kontrolle) nur ca. 80 % infizierte Zellen und lag damit unterhalb der serumfreien Kontrolle, jedoch schloss dies einen neutralisierenden Effekt aus.

B19V-IgG-Titer [U/ml]	
Proband 1	168,0
Proband 2	182,3
Proband 3	183,0
Proband 4	184,9
Proband 5	3,7

Tabelle 4.4: B19V-IgG-Titer der fünf gesunden Probanden. Für die genaue Auswertung (vgl. Tabelle 3.1) und weitere Erläuterungen wird auf die Gebrauchsinformation des Herstellers verwiesen.

Bis auf den etwas niedrigeren Wert des Serums 1 lagen alle IgG-Titer der seropositiven Probanden auf ähnlichem Niveau. Die unterschiedlichen Neutralisationsraten, die mit der Durchflusszytometrie gemessen wurden, korrelierten nicht mit diesen Werten.

Im nächsten Schritt wurde jede Probe im Immunblot hinsichtlich der Antigenspezifität der B19V-spezifischen Antikörper getestet (Abbildung 4.14, Tabelle 4.5).

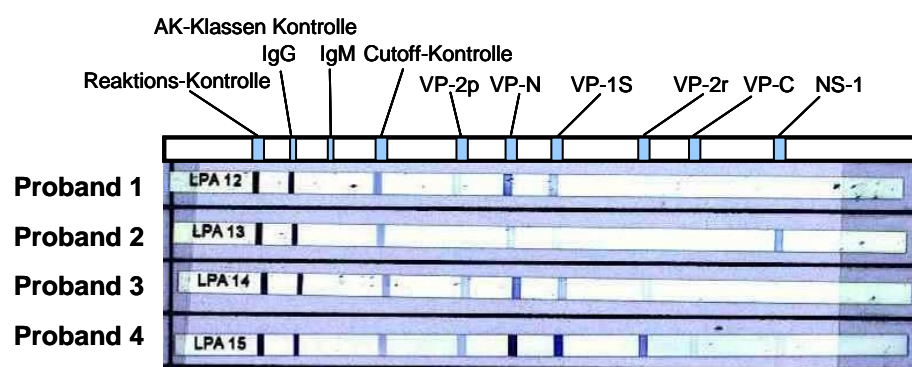


Abbildung 4.14: Immunblots der vier seropositiven Probanden. Es wurde nur auf IgG getestet. Für die genaue Auswertung (vgl. Tabelle 3.2) und weitere Erläuterungen zu den einzelnen Banden wird auf die Gebrauchsinformation des Herstellers verwiesen.

Proband	AK-Klasse	VP-2p	VP-N	VP-1S	VP-2r	VP-C	NS-1	Ergebnis
1	IgG	+/-	++	+/-	-	-	-	positiv
2	IgG	-	+/-	+/-	-	-	+	fraglich positiv
3	IgG	+	++	+	+/-	-	-	positiv
4	IgG	+	+++	+++	++	+/-	+/-	positiv

Tabelle 4.5: Auswertung der Immunblots der vier seropositiven Probanden. Dargestellt ist die schematische Auswertung der Immunblots bzgl. des Musters und der Intensität der erkannten B19V-Antigene für IgG sowie das Ergebnis gemäß der Gebrauchsinformation.

Das Probandenserum 4 hatte nicht nur im Infektionsansatz die stärkste neutralisierende Wirkung, sondern auch im Immunblot das intensivste Bandenmuster. Besonders bei den VP1-Epitopen VP-N und VP-1S kam es zur stärksten Farbreaktion. Das Muster der Probandenserum 1 und 3 war ähnlich. Dieser Befund korrelierte aber nicht mit der neutralisierenden Eigenschaft im Infektionsansatz; Serum 1 war hier schwächer. Die größte Auffälligkeit bot der Immunblot bei Probandenserum 2, dessen Auswertung „fraglich positiv“ ergab. Dies stand im Gegensatz zum neutralisierenden Effekt im Infektionsversuch und des gemessenen IgG-Titers im ELISA.

4.7.2 Patienten mit chronischer Parvovirus-B19-Virämie

Nach der Testung von Probandenserum wurden Serumproben von Patienten mit u.a. chronischer Parvovirus-B19-Infektion untersucht. Diese Proben stammten größtenteils aus der Kinderreumatologie des Universitätsklinikums Giessen und wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Lehmann zur Verfügung gestellt. Als Kontrollen wurden bei jedem Infektionsexperiment das Serum einer seropositiven Person (Proband 4 aus Abbildung 4.13) sowie das Serum einer seronegativen Person (Zellspender Sp2) mitgeführt.

4.7.2.1 Fallbeispiel Patientin SvS

Im folgenden Fallbeispiel wurde das Serum eines 8-jährigen Mädchens untersucht, das an einer chronischen Parvovirus-B19-Infektion mit B19V-reaktiver Arthritis leidet. Zwei Serumproben wurden im Abstand von neun Monaten abgenommen. Es erfolgte ein Vergleich mit den IgG- und IgM-Titern, den spezifischen Antikörperbindungseigenschaften und der B19V-Viruslast (Abbildung 4.15, Tabelle 4.6, Abbildung 4.16, Tabelle 4.7).

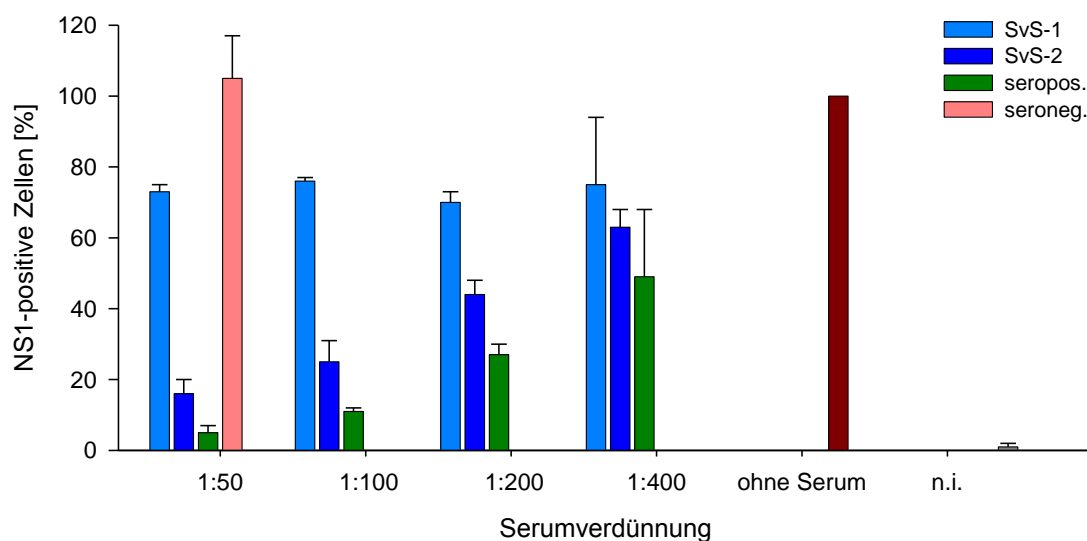


Abbildung 4.15: B19V-Neutralisationskapazität in zwei Seren eines Kindes (Patientin SvS) mit chronischer B19V-Virämie. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der NS1-positiven Zellen, bezogen auf die Population der CD36⁺ Zellen. Die Infektion erfolgte nach dem Grundschem (siehe 3.3.1); zu den Infektionsansätzen wurden 100 µl der angegebenen Serumverdünnung gegeben. Nach der Inkubation wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf das intrazelluläre, virale NS1-Protein untersucht (siehe 3.4.3). Die Proben SvS-1 und SvS-2 repräsentieren zwei Seren eines 8-jährigen Mädchens, welche im Abstand von neun Monaten abgenommen wurden. Als Kontrollen wurden Seren einer seropositiven Person (Proband 4 aus Abbildung 4.13) und einer seronegativen Person (Zellspender Sp2) eingesetzt. Es sind die Mittelwerte aus zwei Experimenten angegeben. Die Infektionsraten der serumfreien Ansätze wurden jeweils als 100 % gesetzt und die korrespondierenden Messwerte darauf normiert; n.i.: nicht infizierte Kontrollen.

Die Infektionsraten bei Einsatz der vier Verdünnungsstufen der Ausgangsprobe SvS-1 lagen alle um 70 % und zeigten damit keinen Hinweis für eine neutralisierende Eigenschaft. Die Folgeprobe SvS-2 konnte auf der Stufe 1:50 die Infektionsrate in beiden Einzelexperimenten unter 20 % halten und zeigte damit einen eindeutigen neutralisierenden Effekt. Dieser war im weiteren Titrationsverlauf noch nachweisbar, aber immer schwächer ausgeprägt als bei der seropositiven Kontrolle.

Probe	IgG [U/ml]	IgM [U/ml]	B19V-DNA [geq/ml]
SvS-1	198,3	207,1	$1,5 \times 10^5$
SvS-2	102,0	2,6	$6,5 \times 10^2$

Tabelle 4.6: B19V-Antikörpertiter und B19V-Viruslast der Patientin SvS. Angegeben sind die im ELISA gemessenen IgG- und IgM-Titer sowie die Viruslast in der PCR in zwei Seren eines 8-jährigen Mädchens mit chronischer B19V-Virämie. Für die genaue Auswertung (vgl. Tabelle 3.1) und weitere Erläuterungen wird auf die Gebrauchsinformationen der Hersteller verwiesen.

Die Ausgangsprobe SvS-1 zeigte hohe Titer für IgG und IgM. Durch das noch hoch-positive IgM war die Frühphase im Infektionsverlauf anzunehmen. Zudem bestand noch eine deutliche Virämie mit $1,5 \times 10^5$ geq/ml. Die Probe SvS-2 war negativ für IgM, aber noch mit geringer Virämie. Zur Untersuchung der qualitativen Antigenbindung des B19V-spezifischen IgG wurde der Immunblot durchgeführt.

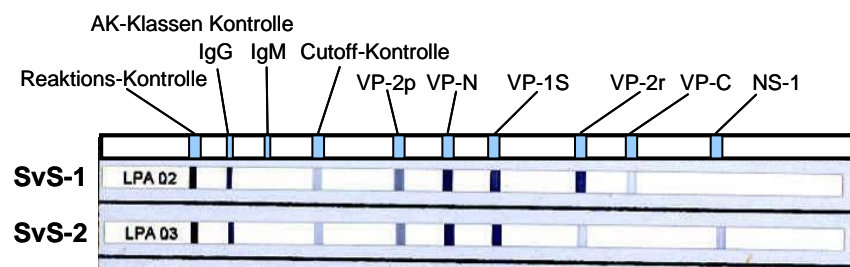


Abbildung 4.16: Immunblots zweier Seren der Patientin SvS. Es wurde nur auf IgG getestet. Für die genaue Auswertung (vgl. Tabelle 3.2) und weitere Erläuterungen zu den einzelnen Banden wird auf die Gebrauchsinformation des Herstellers verwiesen.

Probe	AK-Klasse	VP-2p	VP-N	VP-1S	VP-2r	VP-C	NS-1	Ergebnis
SvS-1	IgG	++	+++	+++	+++	+/-	-	positiv
SvS-2	IgG	++	+++	+++	+	-	+	positiv

Tabelle 4.7: Auswertung der Immunblots der Patientin SvS. Dargestellt ist die schematische Auswertung der Immunblots bzgl. des Musters und der Intensität der erkannten B19V-Antigene für IgG sowie das Ergebnis gemäß der Gebrauchsinformation.

Die Reaktionsintensität beider Serumproben gegen das konformationelle VP2-Epitop VP-2p und die VP1-Epitope VP-N, VP-1S waren gleichwertig. Im Bereich des linearen VP2-Epitops VP-2r hatte schon eine Intensitätsabschwächung stattgefunden. Die neu aufgetretene Bande NS-1 spiegelte zudem das Korrelat des Immunblots bei chronischer Virämie wider.

4.7.2.2 Fallbeispiel Patientin SiSt

Das folgende Fallbeispiel zeigt die Untersuchung von drei Seren eines 12-jährigen Mädchens mit dem klinischen Bild einer Kollagenose und chronischer B19V-Virämie. Die Proben hatten einen zeitlichen Abstand von einem Monat (SiSt-1, SiSt-2) bzw. zwei Monaten (SiSt-2, SiSt-3). Es erfolgte wieder ein Vergleich mit den IgG- und IgM-Titern, den qualitativen Antikörperbindungseigenschaften und der B19V-Viruslast (Abbildung 4.17, Tabelle 4.8, Abbildung 4.18, Tabelle 4.9).

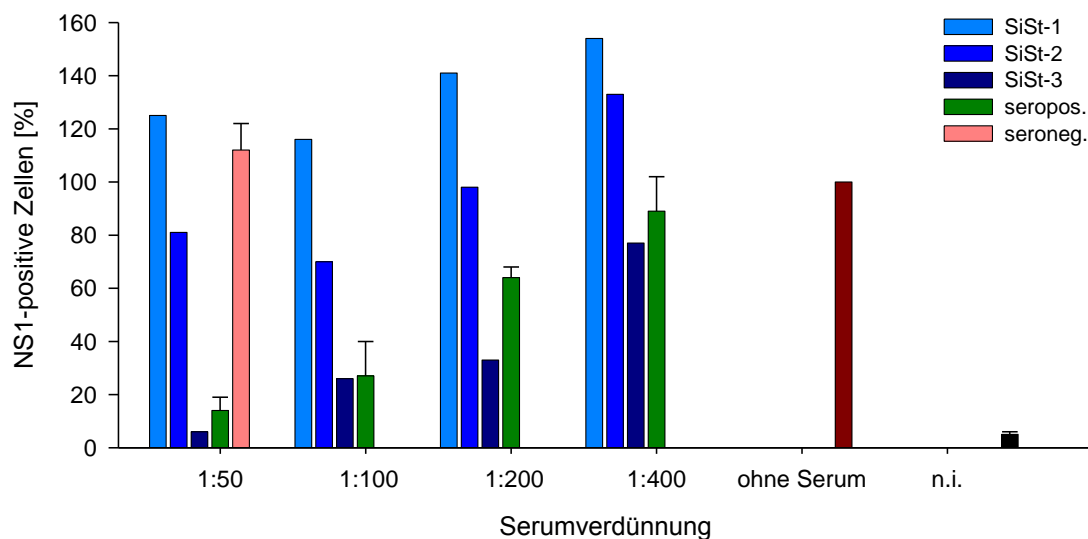


Abbildung 4.17: B19V-Neutralisationskapazität in drei Seren eines Kindes (Patientin SiSt) mit chronischer B19V-Virämie. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der NS1-positiven Zellen, bezogen auf die Population der CD36⁺ Zellen. Die Infektion erfolgte nach dem Grundschem (siehe 3.3.1); zu den Infektionsansätzen wurden 100 µl der angegebenen Serumverdünnung gegeben. Nach der Inkubation wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf das intrazelluläre, virale NS1-Protein untersucht (siehe 3.4.3). Die Proben SiSt-1, SiSt-2 und SiSt-3 repräsentieren drei Seren eines 12-jährigen Mädchens, welche im Abstand von einem bzw. zwei Monaten abgenommen wurden. Als Kontrollen wurden Seren einer seropositiven Person (Proband 4 aus Abbildung 4.13) und einer seronegativen Person (Zellspender Sp2) eingesetzt. Es sind die Mittelwerte aus drei Experimenten angegeben. Die Infektionsraten der serumfreien Ansätze wurden jeweils als 100 % gesetzt und die korrespondierenden Messwerte darauf normiert; n.i.: nicht infizierte Kontrollen.

Es fiel auf, dass die Infektionsraten der seronegativen Kontrolle und mancher Verdünnungsstufen von SiSt-1 und SiSt-2 höher als die der serumfreien Kontrolle lagen. Die seropositive Kontrolle zeigte eine deutliche Neutralisationswirkung. Dagegen ließ die Ausgangsprobe SiSt-1 bereits auf der niedrigsten Verdünnungsstufe keine neutralisierende Eigenschaft erkennen. Zwar lagen alle Infektionsraten von SiSt-2 unterhalb denen von SiSt-1, jedoch täuschten die über 100 % liegenden Infektionsraten von SiSt-1 eine zu große Differenz zu SiSt-2 vor. Die Probe SiSt-3 zeigte den deutlichsten neutralisierenden Effekt und bewirkte eine Reduktion der Infektionsrate um 94 % auf der Stufe 1:50.

Probe	IgG [U/ml]	IgM [U/ml]	B19V-DNA [geq/ml]
SiSt-1	114,1	139,7	$6,3 \times 10^4$
SiSt-2	150,4	28,9	10^2 – 10^3
SiSt-3	232,2	4,3	10^2 – 10^3

Tabelle 4.8: B19V-Antikörpertiter und B19V-Viruslast der Patientin SiSt. Angegeben sind die im ELISA gemessenen IgG- und IgM-Titer sowie die Viruslast in der PCR in drei Seren eines 12-jährigen Mädchens mit chronischer B19V-Virämie. Für die genaue Auswertung (vgl. Tabelle 3.1) und weitere Erläuterungen wird auf die Gebrauchsinformationen der Hersteller verwiesen.

Im zeitlichen Verlauf kam es zu einer stetigen Zunahme des IgG-Titers, was mit der Abnahme an IgM einherging. In der zweiten Probe fiel die Viruslast zwar unter 10^3 geq/ml, stagnierte aber bei SiSt-3 auf diesem Niveau.

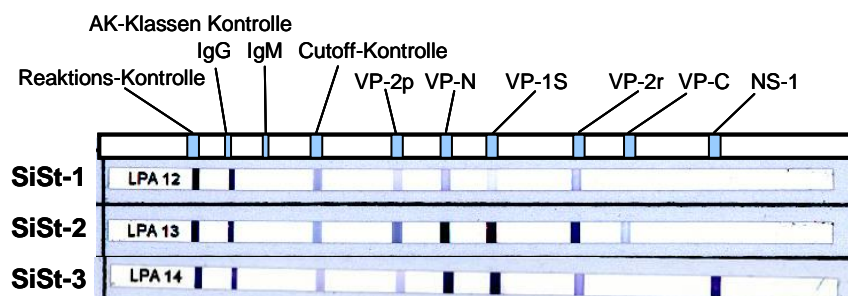


Abbildung 4.18: Immunblots dreier Seren der Patientin SiSt. Es wurde nur auf IgG getestet. Für die genaue Auswertung (vgl. Tabelle 3.2) und weitere Erläuterungen zu den einzelnen Banden wird auf die Gebrauchsinformation des Herstellers verwiesen.

Probe	AK-Klasse	VP-2p	VP-N	VP-1S	VP-2r	VP-C	NS-1	Ergebnis
SiSt-1	IgG	+/-	+	+/-	+	-	-	positiv
SiSt-2	IgG	++	+++	+++	+++	+/-	-	positiv
SiSt-3	IgG	+	+++	+++	++	-	++	positiv

Tabelle 4.9: Auswertung der Immunblots der Patientin SiSt. Dargestellt ist die schematische Auswertung der Immunblots bzgl. des Musters und der Intensität der erkannten B19V-Antigene für IgG sowie das Ergebnis gemäß der Gebrauchsinformation.

Bis auf Antikörper gegen das NS1-Protein, die in den ersten beiden Proben nicht detektiert wurden, kam es bei allen übrigen Epitopen zu einer Steigerung der Bandenintensität. Besonders ausgeprägt war dies für die VP1-spezifischen Epitope VP-N und VP-1S sowie das VP2-spezifische Epitop VP-2r. Die Hauptunterschiede welche die Probe SiSt-3 aufwies, waren einerseits die Abschwächung der Banden VP-2p, VP-2r und VP-C sowie andererseits das Auftreten einer deutlichen NS-1-Bande. Letzteres ist als Ausdruck der chronischen Virämiephase zu werten.

4.7.2.3 Exemplarische Darstellung einzelner Patientenproben ohne Verlaufskontrollen

Im folgenden Abschnitt sind Infektionsexperimente mit Seren von fünf Kindern (Alter: 9–15 Jahre) mit chronischer B19V-Virämie dargestellt. Es waren wieder Patienten aus der Kinderreumatologie des Universitätsklinikums Giessen, von denen uns aber nur Einzelproben zur Verfügung standen. Die Proben waren somit exemplarische Momentaufnahmen ohne Verlaufsbeurteilung und zeigten alle eine niedrige Virämie (10^2 – 10^3 geq/ml). Jedes Experiment beinhaltete die seropositive und seronegative Kontrollprobe sowie die serumfreie Infektionskontrolle. Zusätzlich erfolgten in jeder Probe die Bestimmung der IgG/IgM-Antikörpertiter und der Antikörperspezifität (Abbildung 4.19, Tabelle 4.10, Abbildung 4.20, Tabelle 4.11).

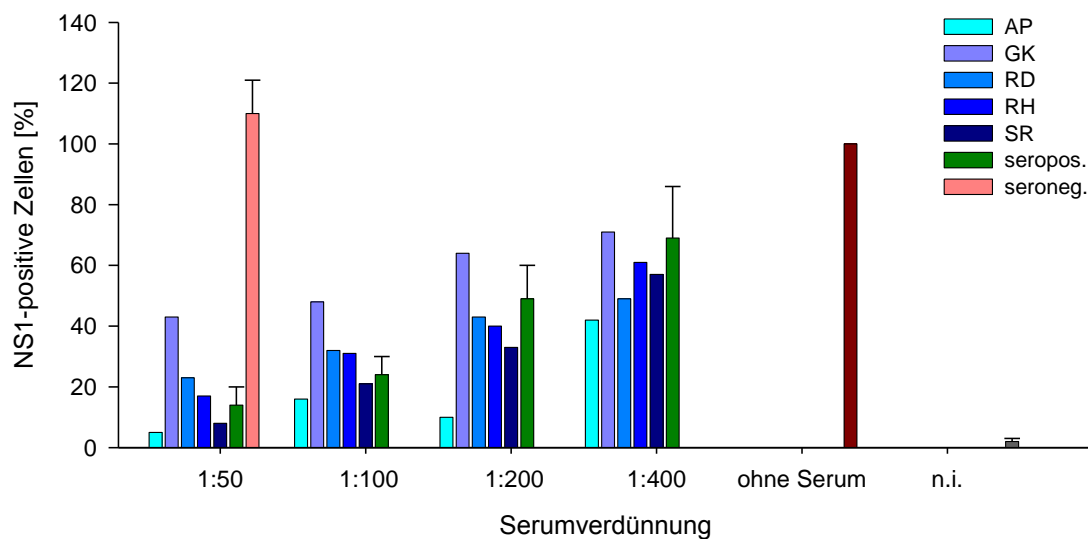


Abbildung 4.19: B19V-Neutralisationskapazität in fünf Seren von Patienten mit chronischer B19V-Virämie. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der NS1-positiven Zellen, bezogen auf die Population der CD36⁺ Zellen. Die Infektion erfolgte nach dem Grundschem (siehe 3.3.1); zu den Infektionsansätzen wurden 100 µl der angegebenen Serumverdünnung gegeben. Nach der Inkubation wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf das intrazelluläre, virale NS1-Protein untersucht (siehe 3.4.3). Die Proben AP, GK, RD, RH und SR repräsentieren fünf Patientenseren. Als Kontrollen wurden Seren einer seropositiven Person (Proband 4 aus Abbildung 4.13) und einer seronegativen Person (Zellspender Sp2) eingesetzt. Es sind die Mittelwerte aus drei Experimenten angegeben. Die Infektionsraten der serumfreien Ansätze wurden jeweils als 100 % gesetzt und die korrespondierenden Messwerte darauf normiert; n.i.: nicht infizierte Kontrollen.

Die Proben RD, RH und SR zeigten auf allen Verdünnungsstufen ein nahezu ähnliches Inhibitionsniveau ohne wesentliche Unterschiede. SR war bei 1:50 aber am stärksten inhibierend, ähnlich der seropositiven Kontrolle. Demgegenüber unterschieden sich die Proben AP und GK deutlich. Diese beiden Patientenproben zeigten einerseits den stärksten (AP) sowie schwächsten (GK) Inhibitionseffekt. Für die Probe GK (1:50) lag die Reduktion der Infektionsrate nur bei ca. 60 %, womit eine suffiziente Inhibition unwahrscheinlich ist.

Probe	IgG [U/ml]	IgM [U/ml]	B19V-DNA [geq/ml]
AP	158,0	9,1	10^2 – 10^3
GK	142,0	10,0	10^2 – 10^3
RD	71,2	6,9	10^2 – 10^3
RH	200,1	61,7	10^2 – 10^3
SR	98,0	24,2	10^2 – 10^3

Tabelle 4.10: B19V-Antikörpertiter und B19V-Viruslast der fünf Patientenseren. Angegeben sind die im ELISA gemessenen IgG- und IgM-Titer sowie die Viruslast in der PCR in fünf Seren chronisch-virämischer Patienten. Für die genaue Auswertung (vgl. Tabelle 3.1) und weitere Erläuterungen wird auf die Gebrauchsinformationen der Hersteller verwiesen.

Die Proben AP, GK und RD waren IgM-negativ, die Probe SR grenzwertig und die Probe RH IgM-positiv. Für IgG wiesen alle fünf Proben einen positiven Titer auf.

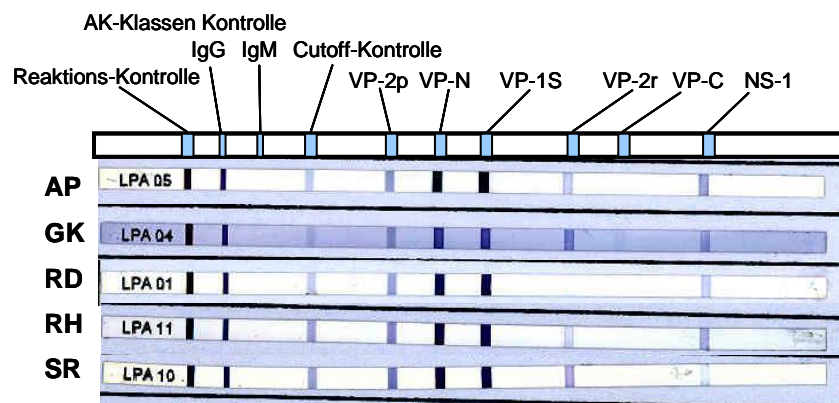


Abbildung 4.20: Immunblots von fünf Patientenseren. Es wurde nur auf IgG getestet. Für die genaue Auswertung (vgl. Tabelle 3.2) und weitere Erläuterungen zu den einzelnen Banden wird auf die Gebrauchsinformation des Herstellers verwiesen.

Probe	AK-Klasse	VP2-p	VP-N	VP-1S	VP-2r	VP-C	NS-1	Ergebnis
AP	IgG	++	+++	+++	+	-	+	positiv
GK	IgG	++	+++	+++	++	+/-	+	positiv
RD	IgG	++	+++	+++	-	-	+	positiv
RH	IgG	++	+++	+++	+/-	-	+	positiv
SR	IgG	++	+++	+++	+	-	+/-	positiv

Tabelle 4.11: Auswertung der Immunblots der fünf Patientenseren. Dargestellt ist die schematische Auswertung der Immunblots bzgl. des Musters und der Intensität der erkannten B19V-Antigene für IgG sowie das Ergebnis gemäß der Gebrauchsinformation.

Durchgehend zeigten alle fünf Proben eine maximale Farbreaktion für die beiden N-terminalen VP1-Epitope VP-N und VP-1S. Etwas schwächer reagierten die Seren mit dem Konformationsepitop VP-2p des VP2-Proteins. Bis auf Proband SR waren in allen Serumproben spezifische IgG-Antikörper gegen das NS1-Protein nachweisbar.

4.7.3 Neutralisationskapazität von B19V-spezifischem IgG und IgM in verschiedenen Phasen der Infektion

Zur Beurteilung der Neutralisationskapazität B19V-spezifischer Immunglobuline in verschiedenen Phasen des Infektionsverlaufs wurden ausgesonderte Plasmaproben eines Blutspendedienstes eingesetzt (Abbildung 4.21). Diese Proben stammten aus klinisch unbemerkten virämischen Phasen, die in der B19V-Routinetestung auffielen. Die Proben sollten nur eine geringe Viruslast aufweisen, um den zusätzlichen B19V-Eintrag in die Infektionsansätze klein zu halten. Es wurden drei Proben ausgewählt: (i) IgG-negativ/IgM-positiv, (ii) IgG-positiv/IgM-positiv und (iii) IgG-positiv/IgM-negativ (interne Bezeichnungen: BP19, BP01 und BP36; Tabelle 4.12 und 4.13).

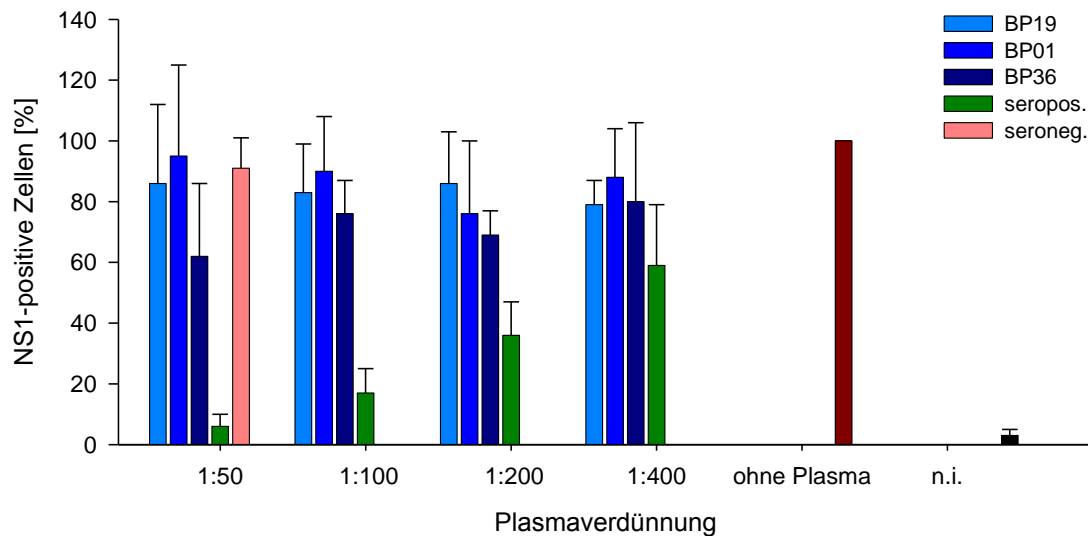


Abbildung 4.21: B19V-Neutralisationskapazität in drei IgG/IgM-haltigen Blutplasmen. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der NS1-positiven Zellen, bezogen auf die Population der CD36⁺ Zellen. Die Infektion erfolgte nach dem Grundschem (siehe 3.3.1); zu den Infektionsansätzen wurden 100 µl der angegebenen Plasma- bzw. Serumverdünnung gegeben. Nach der Inkubation wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf das intrazelluläre, virale NS1-Protein untersucht (siehe 3.4.3). Die Proben BP19, BP01 und BP36 repräsentieren Blutplasmen von virämischen Blutspendern eines Blutspendedienstes. Als Kontrollen wurden Seren einer seropositiven Person (Proband 4 aus Abbildung 4.13) und einer seronegativen Person (Zellspender Sp2) eingesetzt. Es sind die Mittelwerte aus zwei Experimenten angegeben. Die Infektionsraten der plasmafreien Ansätze wurden jeweils als 100 % gesetzt und die korrespondierenden Messwerte darauf normiert; n.i.: nicht infizierte Kontrollen.

Bereits auf der niedrigsten Verdünnungsstufe 1:50 lagen die Infektionsraten in den Ansätzen mit den Proben BP19 und BP01 bei ca. 80 % bzw. 90 % verglichen mit der plasmafreien Kontrolle. Ein neutralisierender Effekt war somit auszuschließen. Dagegen zeigte die Probe BP36 mit ca. 40 %iger Infektionsinhibition auf Stufe 1:50 einen angedeuteten neutralisierenden Effekt, der aber im Vergleich zur Positivkontrolle deutlich schwächer ausfiel.

Probe	IgG [U/ml]	IgM [U/ml]	B19V-DNA [geq/ml]	Infektionsphase
BP19	20,3	124,0	$3,6 \times 10^4$	früh
BP01	130,9	129,9	$4,2 \times 10^4$	↓
BP36	122,1	5,8	negativ	

Tabelle 4.12: B19V-Antikörpertiter und B19V-Viruslast der drei Blutplasmen. Angegeben sind die im ELISA gemessenen IgG- und IgM-Titer sowie die Viruslast in der PCR in Blutplasmen dreier Blutspender. Für die genaue Auswertung (vgl. Tabelle 3.1) und weitere Erläuterungen wird auf die Gebrauchsinformationen der Hersteller verwiesen.

Die Probe BP19 stellte mit ihrem positiven IgM- und negativen IgG-Titer die Frühphase der B19V-Infektion, die Probe BP01 mit positivem IgM und IgG die mittlere Phase, und die Probe BP36 mit wieder negativem IgM bei positivem IgG die Spätphase der Infektion dar. Bis auf die Probe BP36 war in den Proben noch B19V-DNA nachweisbar.

Probe	AK-Klasse	VP-2p	VP-N	VP-1S	VP-2r	VP-C	NS-1	Ergebnis
BP19	IgG	+/-	+	+/-	+/-	-	-	fraglich positiv
	IgM	+++	+++	+++	+++	+	-	positiv
BP01	IgG	++	+/-	-	+++	+	+/-	positiv
	IgM	+	++	+/-	-	-	-	positiv
BP36	IgG	+	++	+	+/-	-	+/-	positiv
	IgM	-	-	-	-	-	-	negativ

Tabelle 4.13: Auswertung der Immunblots der drei Blutplasmen. Dargestellt ist die schematische Auswertung der Immunblots bzgl. des Musters und der Intensität der erkannten B19V-Antigene für IgG und IgM sowie das Ergebnis gemäß der Gebrauchsinformation.

Der positive bzw. negative Nachweis von IgG und IgM im Immunblot war mit den ELISA-Ergebnissen kongruent. Betrachtet man die beiden IgG-positiven Proben BP01 und BP36, so zeigte BP01 im Bereich der VP2-spezifischen Epitope VP-2p (konformationell) und VP-2r (linear) die stärkere Intensität. Die Farbreaktion der IgM-

positiven Probe BP19 war für alle Epitope im Bereich VP1, VP1-*unique region* und VP2 maximal ausgeprägt.

4.8 Berechnung der Verfälschung durch virämisches Probenmaterial

Abschließend wird berechnet, ob es durch virämisches Probenmaterial zu einer relevanten Verfälschung der Infektionsansätze mit zusätzlichen B19V-Genomen gekommen sein könnte. Die höchste Konzentration an B19V-DNA lag mit $1,5 \times 10^5$ geq/ml in der Patientenprobe SvS-1 vor. In der niedrigsten Verdünnungsstufe (1:50) wurden 2 µl Serum (= 300 geq/ml) je Napf eingesetzt. Mit der MOI 1000 wurden zusätzlich 5×10^8 geq/ml eingebracht. Der zusätzliche Eintrag an B19V-DNA aus der virämischen Probe betrug somit lediglich 0,00006 % der eingesetzten B19V-DNA aus dem Plasma BP07 je Napf und ist damit vernachlässigbar.

5 Diskussion

5.1 Kulturverlauf und Differenzierung der Zellen

Grundlage dieser Arbeit war die Etablierung eines Zellkultursystems zur Vermehrung von Parvovirus B19, das als ausschließlich humanpathogenes Virus *in vivo* auf humane, CD36⁺ erythroide Vorläuferzellen angewiesen ist. Die in dieser Arbeit verwendeten CD36⁺ Zellen wurden nach dem Protokoll von Filippone *et al.* ohne Vorselektion aus, in humanen PBMCs enthalten, CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen kultiviert (Filippone *et al.*, 2010). Wong *et al.* konnten die *in-vitro*-Replikationsfähigkeit von B19V in CD36⁺ Zellen zeigen (Wong *et al.*, 2008). Die kontinuierliche Anwesenheit von Erythropoetin im Kulturmedium war sowohl für die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen zu erythroiden Vorläuferzellen, als auch für die erfolgreiche Infektion und Virusreplikation notwendig (Chen *et al.*, 2010a). Wie in einer Biologie-Bachelorarbeit der Arbeitsgruppe gezeigt wurde, führte das im Medium enthaltene Hydrocortison zu einer deutlichen Abnahme von CD3⁺ T-Zellen, CD14⁺ Monozyten/Makrophagen und CD19⁺ B-Zellen (Mansfeld, 2010). Filippone *et al.* erhielten nach zehntägiger Kulturdauer eine Zellpopulation, die zu über 90 % aus Blutgruppen-P-Antigen-positiven, CD36⁺ erythroiden Vorläuferzellen bestand (Filippone *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte trotz eines höheren Anteils von CD34⁺ Zellen bei Inkulturnahme kein derart erfolgreiches Ergebnis erzielt werden. Die probeweise Verlängerung der Kulturdauer auf 13 Tage ergab keine relevante Verbesserung der Zelldifferenzierung. Hilfreich könnte eine neue Zelllinie für CD36⁺ erythroide Vorläuferzellen sein, für die aber noch keine Parvovirus-B19-Infektionsexperimente beschrieben sind (Wong *et al.*, 2010).

Somit zeigten sich zwei Nachteile der durchgeführten Zellkulturmethode, welche die Infektionsversuche einschränkten:

- 1) die Dauer des Kulturverlaufs von zehn Tagen, bis infektionsbereite CD36⁺ Zellen zur Verfügung standen
- 2) der begrenzte Differenzierungsgrad bzw. Anteil differenzierter CD36⁺ Zellen

5.2 Analyse der infizierten Zellen

Die Analyse der infizierten Zellen erfolgte mittels durchflusszytometrischen Nachweises des intrazellulär produzierten, viralen NS1-Proteins. In früheren Untersuchungen wurde mittels PCR die neu gebildete virale mRNA bzw. DNA in den Infektionsansätzen bestimmt. Bei Messung viraler mRNA, muss diese zuerst mit der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden, bevor eine Analyse möglich ist (Bostic *et al.*, 1999; Modrof *et al.*, 2008). Ohne diesen Zwischenschritt kommt die Analyse aus, wenn direkt die neu synthetisierten, viralen DNA-Genome gemessen werden (Saito *et al.*, 2003). Eine Unterscheidung zwischen eingebrachter viraler DNA aus dem zur Infektion verwendeten Virusmaterial und der in infizierten Zellen neu synthetisierten B19V-DNA ist dabei nicht möglich. Abhilfe bietet die hier angewendete Detektion des NS1-Proteins mittels Durchflusszytometrie. Da das NS1-Protein kein Bestandteil des Virions ist und erst in der infizierten Zelle gebildet wird (Cotmore *et al.*, 1986), kann davon ausgegangen werden, dass jede im Durchflusszytometer NS1-positiv detektierte Zelle auch einer B19V-infizierten Zelle entspricht. Mit einer Verarbeitungszeit von ca. 90 Minuten bis zur durchflusszytometrischen Analyse der infizierten Zellen zeigte sich ein Zeitvorteil gegenüber der PCR.

5.3 Einfluss von Zelldifferenzierung, Viruskonzentration und Inkubationszeit auf die Infektionsrate

Es konnte durchflusszytometrisch bestätigt werden, dass ausschließlich in Blutgruppen-P-Antigen- und CD36-positiven erythroiden Vorläuferzellen das virale NS1-Protein gebildet wurde und somit eine erfolgreiche Infektion nachweisbar war. Dies steht im Konsens mit der von Brown *et al.* gemachten Feststellung zur Notwendigkeit des Blutgruppen-P-Antigens für die Aufnahme des Virions in die Zelle (Brown *et al.*, 1993). Wie bei Filippone *et al.* konnte kein signifikanter Einfluss des B19V-Serostatus der Zellspender auf die Infizierbarkeit der Zellen festgestellt werden (Filippone *et al.*, 2010). Aus Probanden- und Zellkulturinfektionen ist bekannt, dass pro 10000 B19V-Partikeln mit lediglich *einem* infektiösen Virion zu rechnen ist (Miyagawa *et al.*, 1999; Bonvicini *et al.*, 2004; Wong und Brown, 2006). Der Rest scheint aus dem hohen Anteil DNA-freier (Bönsch *et al.*, 2008) bzw. nicht infektiöser Kapside zu bestehen. Bei

kleineren MOIs ist im Inkubationsvolumen auch von immer weniger Virus-Zell-Kontakten auszugehen, was zusammen mit dem geringen Anteil infektiöser Virionen bei MOIs kleiner als 10 geq/Zelle zu kaum mehr nachweisbaren Infektionsraten führte. Mit der Ausdehnung der Inkubationszeit auf 72 h zeigte sich die kontinuierliche Abnahme der Infektionsrate bei MOI 1000, was auf die Zytopathogenität von Parvovirus B19 zurückzuführen ist. Die u.a. vom NS1-Protein vermittelte Induktion der Apoptose (Moffatt *et al.*, 1998) verhindert eine kontinuierliche B19V-Vermehrung *in vitro* (Mortimer *et al.*, 1983). Dagegen geben die höheren Infektionsraten für die MOI 100 nach 48-stündiger Inkubation einen Hinweis für die B19V-Vermehrung mit Infektion bisher noch nicht infizierter Zellen.

Es lassen sich zwei Schlussfolgerungen aus diesen Experimenten ziehen:

- 1) Die Abnahme des Anteils infizierter Zellen für die MOI 1000 im Zeitverlauf zeigt den zytopathischen Effekt der Parvovirus-B19-Infektion an.
- 2) Die Zunahme des Anteils infizierter Zellen bei MOI 100 und 48-stündiger Inkubation lässt die Propagierung neuer B19V-Partikel vermuten.

5.4 Einfluss der B19V-Temperaturbehandlung auf die Infektiosität

Im Zellkultursystem wurde die Beeinflussung der Virusinfektiosität nach Temperaturbehandlung untersucht und quantifiziert. Interessanterweise kam es bei den mit 40°C behandelten Proben zu höheren Infektionsraten als bei Raumtemperatur. Möglicherweise lässt sich dies auf die beginnende Externalisierung der VP1-*unique region* zurückführen, was mit einer gesteigerten Infektiosität einhergeht (Ros *et al.*, 2006b). Frühere B19V-Untersuchungen zeigten ebenfalls die Inaktivierung der Virionen mittels 56°C-Behandlung (Young *et al.*, 1984). Somit führt das Verfahren zur thermischen Komplementinaktivierung zu einer empfindlichen Beeinträchtigung der B19V-Infektiosität. Im Gegensatz zu 40°C war eine gesteigerte Infektiosität bei 60°C nicht zu beobachten, obwohl auch hier eine maximale – und irreversible – Externalisierung der VP1-*unique region* beschrieben wurde (Ros *et al.*, 2006b). Es ist vielmehr die beginnende Denaturierung des Kapsids mit Verlust der viralen DNA anzunehmen, bis es schließlich zur vollständigen Zerstörung des Virions kommt (Ros *et al.*, 2006a; Mani *et al.*, 2007). Damit ist Parvovirus B19 deutlich hitzelabiler als

tierpathogene Parvoviren (Yunoki *et al.*, 2003). Dennoch waren auch in den 80°C-Ansätzen noch infektiöse Virionen vorhanden, was die nachweisbaren Infektionsraten zeigten.

In Abwandlung wurden Infektionen mit extrem hohen MOIs (bis 100000 geq/Zelle) nach 60°C-Vorbehandlung durchgeführt. Das Phänomen der Gel-artigen Konsistenz des Napf-Inhalts bei MOI 50000 (Raumtemperatur) schien der Hämagglutination zu entsprechen, die in den Anfängen der Parvovirus-B19-Forschung beschrieben und diagnostisch genutzt wurde (Brown und Cohen, 1992; Sato *et al.*, 1995). Bei 60°C trat dieses Phänomen nicht auf, was auf eine strukturelle Virion-Veränderung mit teils verlorengegangener Virus-Zellrezeptor-Bindung, und damit auch geringerer Infektiosität, hindeutet. Trotz der sehr großen Virusmenge war bei Einsatz der MOI 100000 mit 60°C-Temperaturbehandlung eine ca. 60 %ige Reduktion der Infektionsrate möglich.

Mit dem vorliegenden Infektions- und Detektionssystem ließ sich die temperaturabhängige Beeinflussung der B19V-Infektiosität in ihren Grundzügen darstellen, aber auch die Einschränkungen der thermischen Inaktivierung aufzeigen.

5.5 B19V-Neutralisation mit monoklonalen VP1-, VP2- und NS1-spezifischen Antikörpern und ihren Fab-Fragmenten

Im nächsten Versuchskomplex wurde die Beeinflussung der Infektion mit humanen, monoklonalen Antikörpern (MAb) und ihren Fab-Fragmenten (Fab) getestet, die gegen das VP1-, VP2- bzw. NS1-Protein gerichtet waren. Die Mechanismen, über die Immunglobuline eine Virusneutralisation bewirken, sind sehr vielfältig: Sie basieren beispielsweise auf (i) Störung der Virus-Zellrezeptor-Interaktion, (ii) Störung der Fusion von Virushülle mit der Zellmembran (bei behüllten Viren) und (iii) sterische Behinderung durch Umhüllung der Virionen bzw. ihre gegenseitige Quervernetzung (Klasse und Sattentau, 2002; Reading und Dimmock, 2007). Der jeweilige Neutralisationsmechanismus der B19V-spezifischen Immunglobuline sollte mit Hilfe der Infektionsexperimente aufgeklärt werden.

Da mit Fab-Fragmenten die Ausbildung von Virus-Antikörper-Komplexen ausgeschlossen war, kamen prinzipiell zwei Inhibitionsmechanismen für die Fab-Fragmente in Frage:

- 1) die Umhüllung der Kapside mit sterischer Behinderung der Virus-Zell-Wechselwirkung
- 2) die selektive Blockade wichtiger Strukturen für die (Rezeptor-)Interaktion zwischen Virus und Zelle

Zudem war eine Bindung der Fab-Fragmente an den Fc-Rezeptor von im Zellansatz verbliebenen Immunzellen (u.a. Granulozyten, Monozyten/Makrophagen) ausgeschlossen, was für die Vermittlung einer zellbasierten Immunreaktion verantwortlich wäre (Nimmerjahn und Ravetch, 2008).

Anhand der Berechnung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) wurden die beiden MAbs und ihre Fab-Fragmente bzgl. der Neutralisationskapazität miteinander verglichen. Mit der zusätzlichen Berechnung in mol/l, über die Molekülmasse der MAbs bzw. Fab-Fragmente, sollte der Masseneinfluss des Fc-Teils des intakten IgG-Moleküls rechnerisch entfernt werden. Rechnerisch waren demzufolge je Verdünnungsstufe in µg/ml weniger antigenbindende Fab-Teile in der MAb-Suspension, als ausgedrückt in mol/l. Durch diese Berechnung blieb zwar die Rangfolge der Neutralisationskapazitäten unbeeinflusst, die Fab-Fragmente „verloren“ jedoch dadurch an Kapazität gegenüber den intakten MAbs. In der folgenden Gesamtbewertung wird aber auf eine detailliertere Unterscheidung zwischen den Ergebnissen der beiden Berechnungsmethoden verzichtet.

Insgesamt wurde die höchste Neutralisationskapazität für die VP2-spezifischen Inhibitoren ermittelt. Hier hemmten deutlich niedrigere Konzentrationen die Infektion als bei Einsatz der VP1-spezifischen IgGs. In früheren Berechnungen der IC_{50} stellte sich ein gegenteiliges Ergebnis mit Überlegenheit des VP1-spezifischen MAb gegenüber dem VP2-spezifischen dar (Gigler *et al.*, 1999). Die Messmethode (lichtmikroskopische Quantifizierung der Zellkoloniebildung) und die mathematische Auswertung (Berechnung über lineare Interpolation) waren aber nicht mit den aktuell angewendeten Methoden identisch.

Da mit den Fab-Fragmenten eine Quervernetzung der Virionen unmöglich war, aber schon eine geringe Menge des Fab 860-55 für die IC_{50} ausreichte, schien ein auf sterische Behinderung beruhender Effekt unwahrscheinlich. Deshalb kam am ehesten ein Neutralisationseffekt über die Blockade einer wichtigen Struktur in Frage, die für die Interaktion des Virions mit der Zelle entscheidend war. Als ein wichtiger Zellrezeptor für die Virus-Interaktion wurde das Globosid Blutgruppen-P-Antigen identifiziert (Brown *et al.*, 1993), über das kryoelektronenmikroskopisch die Bindung rekombinanter, leerer VP2-Kapside nachgewiesen werden konnte (Chipman *et al.*, 1996). Es ist nun zu vermuten, dass die VP2-spezifischen Fab-Fragmente diese wichtige VP2-Struktur am Virion direkt bzw. in unmittelbarer Nähe blockierten. Der Neutralisationseffekt, der durch den intakten MAb 860-55 bewirkt wurde, war nur um wenig schwächer als der seiner Fab-Fragmente. Möglicherweise behinderten sich die intakten Immunglobuline aufgrund ihrer Größe gegenseitig und konnten diese Zielstruktur nicht so optimal wie die Fab-Fragmente erreichen.

Bei den schlechter neutralisierenden VP1-spezifischen Inhibitoren zeigte sich eine Überlegenheit des intakten MAb 1418 gegenüber seinen Fab-Fragmenten. Dies legt den Schluss nahe, dass im Gegensatz zu den VP2-spezifischen Inhibitoren keine essenzielle Rezeptorstruktur involviert war und die Neutralisation vor allem über die sterische Behinderung bzw. Quervernetzung erfolgte.

Kryoelektronenmikroskopische Strukturanalysen, wie sie bei Neutralisationsversuchen mit MAbs und Fab-Fragmenten mit tierpathogenen Parvoviren durchgeführt wurden (Nelson *et al.*, 2007; Hafenstein *et al.*, 2009), liegen für Parvovirus B19 und den in dieser Arbeit verwendeten MAbs und Fab-Fragmenten nicht vor. Komplexere Vorgänge im Neutralisationsverhalten sind aber anzunehmen. Deshalb basieren folgende Schlussfolgerungen zum jeweiligen Neutralisationsmechanismus ausschließlich auf der Beurteilung der berechneten IC_{50} :

- 1) Die Immunglobuline gegen das VP2-Protein wirken über die Blockade wichtiger Strukturen für die Virus-Zellrezeptor-Interaktion.
- 2) Die Immunglobuline gegen das VP1-Protein wirken über eine sterische Behinderung bzw. Quervernetzung (Aggregation) der Virionen.

5.6 B19V-Neutralisation mit humanen Seren

Mit der Testung der neutralisierenden Eigenschaft von Blutseren B19V-seropositiver Personen wurde ein direkter Bezug zu klinischen Laborparametern (IgG/IgM-Antikörperstatus, Antigenbindungsmuster, Virämie) hergestellt. Mittels dieser Parameter kann die zeitliche Einordnung des individuellen Infektionsverlaufs erfolgen. Bei anhaltender Virämie muss von einer chronischen Infektion bei unzureichender Neutralisationskapazität der B19V-spezifischen Antikörper ausgegangen werden.

Die Seren von gesunden, B19V-seropositiven Probanden zeigten trotz ähnlich hoher IgG-Titer ein sehr differenziertes Bild bzgl. der neutralisierenden Eigenschaft. Der Antikörpertiter bot demnach kein verlässliches Kriterium zur Beurteilung der Neutralisationskapazität, wie es auch z.B. bei CMV (Schmitz und Essuman, 1986) und den Masern (Rabenau *et al.*, 2007) beobachtet wurde. Bostic *et al.* konnten in B19V-Infektionsexperimenten ebenfalls keine Korrelation zwischen der Neutralisationskapazität von Probandenseren und dem IgG-Titer finden (Bostic *et al.*, 1999). Das Antikörper-Bindungsmuster im Immunblot zeigte dagegen größere Unterschiede zwischen den einzelnen Probandenseren.

Zusammenfassend wurden aus den Probandenversuchen folgende Aussagen abgeleitet:

- 1) Der IgG-Titer ließ keine Korrelation mit dem Bindungsmuster erkennen.
- 2) Sowohl IgG-Titer als auch Bindungsmuster zeigten keinen Zusammenhang mit der neutralisierenden Wirkung.

5.6.1 Fallbeispiele der chronisch-virämischen Patientinnen SvS und SiSt

Im Fallbeispiel SvS (siehe 4.7.2.1) handelte es sich um ein 8-jähriges Mädchen, das zusätzlich zur chronischen Parvovirus-B19-Infektion auch an einer B19V-reaktiven Arthritis litt. Aufgrund des hohen IgM-Titers des nicht neutralisierenden Ausgangsserums SvS-1 war anzunehmen, dass das Serum aus der Frühphase der Infektion stammte und deshalb die Virämie noch nicht chronisch war. Dies traf dann für die Vergleichsprobe SvS-2 zu, die neun Monate später weiterhin B19V-DNA enthielt, aber bereits eine deutliche Neutralisationskapazität zeigte. In Anbetracht der reduzierten Viruslast schien der Übergang in die Rekonvaleszenzphase vorzuliegen, der von der Antikörperreife und Steigerung der Neutralisationskapazität bestimmt ist und zur

Besserung der klinischen Symptomatik führt (Bostic *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2003). Chronische Parvovirus-B19-Virämien wurden z.B. bei immungeschwächten Kindern über einen Zeitraum von zehn Monaten beobachtet (Flunker *et al.*, 1998). Speziell bei Kindern mit B19V-assoziierten rheumatischen Erkrankungen bzw. juveniler Arthritis waren gehäuft – teils jahrelange – Virämien zu finden gewesen (Oğuz *et al.*, 2002; Lehmann *et al.*, 2003, 2008b; Weissbrich *et al.*, 2007). Zudem wurde auch ein signifikant höherer Anteil an NS1-spezifischem IgG festgestellt. Eine frustrane Infektionskontrolle mit fehlender B19V-Eradikation trotz eines hohen IgG-Titers wurde aber auch bei immunkompetenten Erwachsenen mehrfach beobachtet (Faden *et al.*, 1992; Cassinotti *et al.*, 1993; Musiani *et al.*, 1995).

Im Fallbeispiel SiSt (siehe 4.7.2.2) wurden drei Serumproben eines 12-jährigen Mädchens untersucht, das an einer chronischen B19V-Virämie und Kollagenose litt. Analog zu SvS-1 ist SiSt-1 als nicht neutralisierende Probe der Infektionsfrühphase mit hohem IgM-Titer zu werten. Die normierten Infektionsraten von SiSt-1 lagen alle über 120 % und täuschten eine zu große Differenz zu den niedrigeren von SiSt-2 vor. Doch trotz dieser Einschränkung schien innerhalb des Zeitabstands von einem Monat eine Phase getroffen worden zu sein, in der es bereits zu einer qualitativen Veränderung der Immunglobuline mit Verbesserung der Virusneutralisation bei SiSt-2 kam. Zwei Monate später konnte schließlich mit SiSt-3 eine eindeutige neutralisierende Wirkung nachgewiesen werden. Im Bindungsmuster des Immunblots zeigte sich u.a. die Bande VP-1S bei SiSt-2 und SiSt-3 stark ausgeprägt, was die VP1-*unique region* repräsentiert. Dieser Struktur wurde eine wesentliche Bedeutung für die Bildung neutralisierender Antikörper zugeschrieben (Bansal *et al.*, 1993; Palmer *et al.*, 1996). Klinisch war aber noch keine vollständige Viruselimination eingetreten. Diese Konstellation der frustranen B19V-Elimination trotz breiter B19V-Antikörperspezifität konnte an koreanischen Blutplasmaspendern ebenfalls mittels *recomLine* Immunblot gezeigt werden; anhaltend niedrige Virämien (10^2 – 10^3 geq/ml) blieben über Monate nachweisbar (Oh *et al.*, 2010). Die Probe SiSt-3 zeigt – wie SvS-2 –, dass ein (hoher) IgG- und negativer IgM-Titer nicht immer als abgelaufene Infektion gewertet werden darf, da sich dahinter eine anhaltende Virämie verbergen kann (Dobec *et al.*, 2007). Insgesamt ähnelt das Fallbeispiel SiSt dem Fallbeispiel SvS, zeigt aber innerhalb einer kürzeren Zeitspanne die Entwicklung einer gesteigerten B19V-Neutralisationskapazität.

5.6.2 Neutralisationskapazität von B19V-spezifischem IgG und IgM im Infektionsverlauf

Die neutralisierende Eigenschaft der Antikörper im Verlauf der B19V-Infektion wurde mit Plasmaproben aus dem Bestand eines Blutspendedienstes untersucht. Drei Proben repräsentierten aufgrund ihres unterschiedlichen IgG- und IgM-Titers verschiedene B19V-Infektionsphasen (vgl. Tabelle 4.12). Weder der hohe IgM-Titer in der Infektionsfrühphase bei BP19, noch das IgG bei BP01 und BP36 im späteren Infektionsverlauf boten aber die Möglichkeit zur ausreichenden B19V-Neutralisation. Der negative Nachweis der B19V-DNA bei BP36 ließ eine klinisch suffiziente Viruskontrolle bzw. -elimination erkennen, was jedoch im durchgeführten Neutralisationsexperiment nicht darstellbar gewesen war.

Der Reifungsprozess spezifischer Antikörper im Verlauf der Immunantwort wird in der Immunologie mit den Begriffen *Affinität* und *Avidität* beschrieben (Janeway et al., 2009): Die *Affinität* bezeichnet die Bindungsstärke zwischen einem Antikörper und seinem Antigen bezogen auf eine einzige Antigenbindungsstelle. Die Gesamtheit aller Affinitäten dieser Antigen-Antikörper-Interaktion ergibt die *Avidität*. Je mehr chemische Bindungen zwischen dem Antigen und dem Antikörper bestehen, desto größer ist die Avidität. Je weiter der Reifungsprozess fortgeschritten ist, desto höher ist die Avidität der Antikörper.

Für Parvovirus B19 basierte die Messung spezifischer IgG-Aviditäten auf den VP1- und VP2-Strukturproteinen, was einen zusätzlichen Vorteil für die serologische Diagnostik bot (Gray et al., 1993; Söderlund et al., 1995a). Aufgrund der diagnostischen Bedeutung einer B19V-Infektion in der Schwangerschaft wurde bei Schwangeren die Avidität der IgG-Antikörper gemessen und dem zeitlichen Verlauf der B19V-Infektion gegenübergestellt (Enders et al., 2006). Der Anteil der Antikörper mit hoher Avidität stieg dabei innerhalb von zwölf Wochen nach Infektion von 2 % auf 61 % an. Die Beurteilung der B19V-Neutralisationsfähigkeit war diesen Labormethoden dagegen nicht immer zugänglich. Hier liegt u.a. das Gewicht des Infektions- und Neutralisationsansatzes, wie er in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde.

Zur Beurteilung der Neutralisationskapazität B19V-spezifischer IgM-Antikörper konnten fünf Patientenproben herangezogen werden. Die Serumproben SvS-1 und SiSt-1 enthielten zusätzlich hohe B19V-IgG-Titer, wobei keine dieser Proben einen neutralisierenden Effekt aufwies. Die Serumprobe RH war ebenfalls IgG/IgM-positiv und zeigte einen deutlichen Neutralisationseffekt. Welchen Anteil das IgG bzw. IgM an diesem Effekt hatte, wurde nicht differenziert. Abschließend sind nochmals die Plasmaproben BP01 und BP19 mit positiven B19V-IgM-Titern, aber fehlender neutralisierender Wirkung, aufzuführen. Abgesehen von der Probe RH konnte demnach mit keiner IgM-positiven Probe eine relevante B19V-Neutralisation erzielt werden. In zwei B19V-Neutralisationsexperimenten wurde dagegen auch für IgM-Antikörper eine neutralisierende Wirkung beschrieben (Young *et al.*, 1984; Morey *et al.*, 1992). Bei anderen Viren ergibt sich für eine IgM-vermittelte Neutralisation ein differenziertes Bild. In Immunisierungsstudien war sie bei einem Adenovirus- (Gahéry-Ségard *et al.*, 1997) bzw. Pockenimpfstoff (Moyron-Quiroz *et al.*, 2009) nachweisbar. Dagegen zeigten Experimente mit HIV-1 keinen wesentlichen Neutralisationseffekt der IgM-Antikörper (Kunert *et al.*, 2004). Für B19V-spezifische IgM-Antikörper wurden zudem Kreuzreaktionen mit viralen (CMV, EBV, Masern, Röteln) (Jensen und Vestergaard, 1997; Thomas *et al.*, 1999) und bakteriellen (Borrelien) (Tuuminen *et al.*, 2011) Antigenen gefunden. Dies könnte als Hinweis für den geringen Neutralisationseffekt der IgM-haltigen Seren aufgrund zu geringer B19V-Spezifität und -Avidität gewertet werden. Ebenso ist bei den IgG/IgM-positiven Patientenseren SvS-1, SiSt-1 und BP01 ein Konkurrieren zwischen IgG- und IgM-Antikörpern um die Antigenbindungsstellen in Betracht zu ziehen (Kingsford *et al.*, 1983; Simon *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1996). Dies würde bei niedrig avidem IgM einerseits selbst zu keinem erfolgreichen Neutralisationseffekt führen, andererseits den Neutralisationseffekt des höher aviden IgGs beeinträchtigen.

5.7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Zellkultursystem etabliert werden, mit dem aus peripheren CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen die CD36⁺ erythroiden Vorläuferzellen generiert wurden. Hiermit war eine – wenn auch eingeschränkte – Vermehrung von Parvovirus B19 möglich, welche die notwendige Grundlage der Infektionsansätze darstellte. Die Entwicklung eines effizienteren Zellkultursystems würde eine entscheidende Verbesserung darstellen, um die gefundenen Schwankungen im Kulturverlauf bei Verwendung primärer Zellen zu umgehen. Eine kontinuierliche Zelllinie böte hier auch einen zeitlichen Vorteil, um infizierbare Zellen schneller und in ausreichender Anzahl zu erhalten. Basierend auf der durchflusszytometrischen Analyse infizierter Zellen wären dann ausgedehnte Testungen von Seren möglich, die eine Hilfestellung für die Beurteilung des Immunstatus eines Patienten bieten. Auch im Bereich der Transfusionsmedizin stellt dieses System eine Möglichkeit dar, infektiöse Virionen in klinischem Material zu quantifizieren und damit die Sicherheit von Blutprodukten zu erhöhen. Im Vergleich zur PCR-basierten Analyse der Virusreplikation stellt die Durchflusszytometrie eine interessante Alternative dar, was auf die Vorbereitungszeit und Analysedauer sowie die reduzierte Kontaminationsgefahr zurückzuführen ist.

Zusammenfassung

Parvovirus B19 (B19V) ist ausschließlich humanpathogen und die Ursache der Kinderkrankheit Ringelröteln (*Erythema infectiosum*). Die Infektion und Vermehrung von B19V ist auf CD36⁺ erythroide Vorläuferzellen beschränkt, deren Zerstörung zur Ausbildung einer Anämie, bis hin zur aplastischen Krise, führen kann. Bei akuten Infektionen in der Schwangerschaft ist der diaplazentare Übertritt des Virus auf den Fötus mit Auslösung des anämiebedingten *Hydrops fetalis* möglich.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Zellkultursystem etabliert, mit dem die Replikation von Parvovirus B19 und Messung der Menge infektiöser B19V-Partikel möglich war. Aus peripheren, humanen CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen wurden die CD36⁺ erythroiden Vorläuferzellen gewonnen, mit B19V infiziert und die Infektionsraten durchflusszytometrisch mit einem fluoreszenzfarbstoffgekoppelten, monoklonalen Antikörper (MAb) gemessen, der spezifisch gegen das intrazelluläre, virale NS1-Protein gerichtet war. Mit diesem Infektions- und Nachweissystem konnten die vorhandenen, aber unterschiedlich ausgeprägten, neutralisierenden Eigenschaften der VP2- und VP1-spezifischen MAb und ihrer Fab-Fragmente gezeigt werden. Der VP2-spezifische MAb und seine Fab-Fragmente waren stärker inhibierend als die VP1-spezifischen Immunglobuline. Dieses weist darauf hin, dass als Neutralisationsmechanismus die Blockade bzw. Beeinflussung wichtiger Virus-Zellrezeptor-Strukturen vorlag.

Weiterhin wurden die neutralisierenden Eigenschaften der B19V-spezifischen Antikörper in Seren von gesunden Probanden mit abgelaufener B19V-Infektion und von chronisch-virämischen Patienten gemessen. Der Bezug zu erhobenen Laborwerten (IgG/IgM-Antikörperstatus, Virämie) und den klinischen Verläufen zeigte die erweiterten Möglichkeiten dieses Infektionssystems. Es konnte die Neutralisationskapazität der Immunglobuline in humanen Seren direkt darstellen und deckte wesentliche Unterschiede in der Beurteilung des, auf herkömmlichen Labormethoden (ELISA, Immunblot) basierenden, Antikörperstatus auf. Zudem ließ sich kein kontinuierlicher Neutralisationseffekt B19V-spezifischer, IgM-haltiger Seren nachweisen, was auf eine eingeschränkte IgM-Neutralisationskapazität hindeutete.

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
B19V	Parvovirus B19
BFU-E	<i>erythroid burst-forming unit</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFU-E	<i>erythroid colony-forming unit</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPC	<i>erythroid progenitor cells</i>
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FKS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
geq	<i>genome equivalent</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IgG, IgM	Immunglobulin G, M
IL	Interleukin
ITR	<i>inverted terminal repeats</i>
kDa	Kilodalton
MAb	<i>monoclonal antibody</i>
MEM	<i>minimal essential medium</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n.i.	nicht infiziert
NS1	Nichtstrukturprotein 1
ORF	<i>open reading frame</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin

PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
p.i.	<i>post infectionem</i>
PLA ₂	Phospholipase A2
qPCR	quantitative PCR
rhu	<i>recombinant human</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real-time</i> PCR
SCF	<i>stem cell factor</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SSC	<i>side scatter</i>
U	<i>Unit</i>
VLP	<i>virus-like particle</i>
VP1, VP2	Virales Strukturprotein 1, 2
VP1 _u	VP1- <i>unique region</i>

Literaturverzeichnis

Adamson L.A., Fowler L.J., Clare-Salzler M.J., Hobbs J.A. (2011). Parvovirus B19 infection in Hashimoto's thyroiditis, papillary thyroid carcinoma, and anaplastic thyroid carcinoma. *Thyroid* 21, 411–417.

Adler S.P., Manganello A.M., Koch W.C., Hempfling S.H., Best A.M. (1993). Risk of human parvovirus B19 infections among school and hospital employees during endemic periods. *J. Infect. Dis.* 168, 361–368.

Anderson L.J., Tsou C., Parker R.A., Chorba T.L., Wulff H., Tattersall P., Mortimer P.P. (1986). Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 24, 522–526.

Anderson M.J., Higgins P.G., Davis L.R., Willman J.S., Jones S.E., Kidd I.M., Pattison J.R., Tyrrell D.A. (1985). Experimental parvoviral infection in humans. *J. Infect. Dis.* 152, 257–265.

Anderson M.J., Jones S.E., Fisher-Hoch S.P., Lewis E., Hall S.M., Bartlett C.L., Cohen B.J., Mortimer P.P., Pereira M.S. (1983). Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)? *Lancet* 1, 1378.

Anderson M.J., Lewis E., Kidd I.M., Hall S.M., Cohen B.J. (1984). An outbreak of erythema infectiosum associated with human parvovirus infection. *J Hyg (Lond)* 93, 85–93.

Astell C.R., Chow M.B., Ward D.C. (1985). Sequence analysis of the termini of virion and replicative forms of minute virus of mice DNA suggests a modified rolling hairpin model for autonomous parvovirus DNA replication. *J. Virol.* 54, 171–177.

B-19 Parvovirus Vaccine Study [<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00379938>].

Balfour H.H. Jr (1969). Erythema infectiosum (fifth disease). Clinical review and description of 91 cases seen in an epidemic. *Clin Pediatr (Phila)* 8, 721–727.

Ballou W.R., Reed J.L., Noble W., Young N.S., Koenig S. (2003). Safety and immunogenicity of a recombinant parvovirus B19 vaccine formulated with MF59C.1. *J. Infect. Dis.* 187, 675–678.

Bansal G.P., Hatfield J.A., Dunn F.E., Kramer A.A., Brady F., Riggin C.H., Collett M.S., Yoshimoto K., Kajigaya S., Young N.S. (1993). Candidate recombinant vaccine for human B19 parvovirus. *J. Infect. Dis.* 167, 1034–1044.

Beersma M.F.C., Claas E.C.J., Sopaheluakan T., Kroes A.C.M. (2005). Parvovirus B19 viral loads in relation to VP1 and VP2 antibody responses in diagnostic blood samples. *J. Clin. Virol.* 34, 71–75.

- Bernstein D.I., El Sahly H.M., Keitel W.A., Wolff M., Simone G., Segawa C., Wong S., Shelly D., Young N.S., Dempsey W. (2011). Safety and immunogenicity of a candidate parvovirus B19 vaccine. *Vaccine* 29, 7357–7363.
- Blümel J., Eis-Hübinger A.M., Stühler A., Bönsch C., Gessner M., Löwer J. (2005). Characterization of Parvovirus B19 genotype 2 in KU812Ep6 cells. *J. Virol.* 79, 14197–14206.
- Blümel J., Schmidt I., Effenberger W., Seitz H., Willkommen H., Brackmann H.H., Löwer J., Eis-Hübinger A.M. (2002). Parvovirus B19 transmission by heat-treated clotting factor concentrates. *Transfusion* 42, 1473–1481.
- Blümel J., Stühler A., Dichtelmüller H. (2008). Kinetics of inactivating human parvovirus B19 and porcine parvovirus by dry-heat treatment. *Transfusion* 48, 790.
- Blundell M.C., Beard C., Astell C.R. (1987). In vitro identification of a B19 parvovirus promoter. *Virology* 157, 534–538.
- Bönsch C., Kempf C., Ros C. (2008). Interaction of parvovirus B19 with human erythrocytes alters virus structure and cell membrane integrity. *J. Virol.* 82, 11784–11791.
- Bonvicini F., Gallinella G., Cricca M., Ambretti S., Delbarba S., Musiani M., Zerbini M. (2004). Molecular testing for detection of in vitro infectivity of plasma pools contaminated with B19 virus. *J. Med. Virol.* 74, 272–276.
- Bonvicini F., Manaresi E., Gallinella G., Gentilomi G.A., Musiani M., Zerbini M. (2009). Diagnosis of fetal parvovirus B19 infection: value of virological assays in fetal specimens. *BJOG* 116, 813–817.
- Bonvicini F., Marinacci G., Pajno M.C., Gallinella G., Musiani M., Zerbini M. (2008). Meningoencephalitis with persistent parvovirus B19 infection in an apparently healthy woman. *Clin. Infect. Dis.* 47, 385–387.
- von dem Borne A.E., Bos M.J., Joustra-Maas N., Tromp J.F., van't Veer M.B., van Wijngaarden-du Bois R., Tetteroo P.A. (1986). A murine monoclonal IgM antibody specific for blood group P antigen (globoside). *Br. J. Haematol.* 63, 35–46.
- Bostic J.R., Brown K.E., Young N.S., Koenig S. (1999). Quantitative analysis of neutralizing immune responses to human parvovirus B19 using a novel reverse transcriptase-polymerase chain reaction-based assay. *J. Infect. Dis.* 179, 619–626.
- Bredl S., Plentz A., Wenzel J.J., Pfister H., Möst J., Modrow S. (2011). False-negative serology in patients with acute parvovirus B19 infection. *J. Clin. Virol.* 51, 115–120.
- Bremner J.A., Beard S., Cohen B.J., Alimenti A., Cantiniaux B., Levy J. (1993). Secondary infection with parvovirus B19 in an HIV-positive patient. *AIDS* 7, 1131–1132.

- Brown K.E., Anderson S.M., Young N.S. (1993). Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* 262, 114–117.
- Brown K.E., Cohen B.J. (1992). Haemagglutination by parvovirus B19. *J. Gen. Virol.* 73 (Pt 8), 2147–2149.
- Brown K.E., Hibbs J.R., Gallinella G., Anderson S.M., Lehman E.D., McCarthy P., Young N.S. (1994). Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N. Engl. J. Med.* 330, 1192–1196.
- Brown K.E., Mori J., Cohen B.J., Field A.M. (1991). In vitro propagation of parvovirus B19 in primary foetal liver culture. *J. Gen. Virol.* 72 (Pt 3), 741–745.
- Brown T., Anand A., Ritchie L.D., Clewley J.P., Reid T.M. (1984). Intrauterine parvovirus infection associated with hydrops fetalis. *Lancet* 2, 1033–1034.
- Cassinotti P., Bas S., Siegl G., Vischer T.L. (1995). Association between human parvovirus B19 infection and arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 54, 498–500.
- Cassinotti P., Schultze D., Schlageter P., Chevili S., Siegl G. (1993). Persistent human parvovirus B19 infection following an acute infection with meningitis in an immunocompetent patient. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12, 701–704.
- Chauvet A., Dewilde A., Thomas D., Joriot S., Vaast P., Houfflin-Debarge V., Subtil D. (2011). Ultrasound diagnosis, management and prognosis in a consecutive series of 27 cases of fetal hydrops following maternal parvovirus B19 infection. *Fetal. Diagn. Ther.* 30, 41–47.
- Chen A.Y., Guan W., Lou S., Liu Z., Kleiboeker S., Qiu J. (2010a). Role of erythropoietin receptor signaling in parvovirus B19 replication in human erythroid progenitor cells. *J. Virol.* 84, 12385–12396.
- Chen A.Y., Zhang E.Y., Guan W., Cheng F., Kleiboeker S., Yankee T.M., Qiu J. (2010b). The small 11 kDa nonstructural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells. *Blood* 115, 1070–1080.
- Chipman P.R., Agbandje-McKenna M., Kajigaya S., Brown K.E., Young N.S., Baker T.S., Rossmann M.G. (1996). Cryo-electron microscopy studies of empty capsids of human parvovirus B19 complexed with its cellular receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 7502–7506.
- Chisaka H., Morita E., Yaegashi N., Sugamura K. (2003). Parvovirus B19 and the pathogenesis of anaemia. *Rev. Med. Virol.* 13, 347–359.
- Chorba T., Coccia P., Holman R.C., Tattersall P., Anderson L.J., Sudman J., Young N.S., Kurczynski E., Saarinen U.M., Moir R. (1986). The role of parvovirus B19 in aplastic crisis and erythema infectiosum (fifth disease). *J. Infect. Dis.* 154, 383–393.

- Cohen B.J., Beard S., Knowles W.A., Ellis J.S., Joske D., Goldman J.M., Hewitt P., Ward K.N. (1997). Chronic anemia due to parvovirus B19 infection in a bone marrow transplant patient after platelet transfusion. *Transfusion* 37, 947–952.
- Compston L.I., Sarkobie F., Li C., Candotti D., Opare-Sem O., Allain J.-P. (2008). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of latent and persistent viral genomes in cellular or plasma blood fractions. *J. Virol. Methods* 151, 47–54.
- Corcioli F., Zakrzewska K., Rinieri A., Fanci R., Innocenti M., Civinini R., De Giorgi V., Di Lollo S., Azzi A. (2008). Tissue persistence of parvovirus B19 genotypes in asymptomatic persons. *J. Med. Virol.* 80, 2005–2011.
- Corcoran A., Mahon B.P., Doyle S. (2004). B cell memory is directed toward conformational epitopes of parvovirus B19 capsid proteins and the unique region of VP1. *J. Infect. Dis.* 189, 1873–1880.
- Cossart Y.E., Field A.M., Cant B., Widdows D. (1975). Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* 1, 72–73.
- Cotmore S.F., McKie V.C., Anderson L.J., Astell C.R., Tattersall P. (1986). Identification of the major structural and nonstructural proteins encoded by human parvovirus B19 and mapping of their genes by procaryotic expression of isolated genomic fragments. *J. Virol.* 60, 548–557.
- Cotmore S.F., Tattersall P. (2007). Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Adv. Virus Res.* 70, 183–232.
- Deiss V., Tratschin J.D., Weitz M., Siegl G. (1990). Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini. *Virology* 175, 247–254.
- Díaz F., Collazos J., Mendoza F., De La Viuda J.M., Cazallas J., Urkijo J.C., Flores M. (2002). Systemic lupus erythematosus associated with acute parvovirus B19 infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 8, 115–117.
- Dobec M., Juchler A., Flaviano A., Kaeppli F. (2007). Prolonged parvovirus b19 viremia in spite of neutralizing antibodies after erythema infectiosum in pregnancy. *Gynecol. Obstet. Invest.* 63, 53–54.
- Dobec M., Kaeppli F., Cassinotti P., Satz N. (2008). Persistent parvovirus B19 infection and arthralgia in a patient mistakenly treated for Lyme disease. *J. Clin. Virol.* 43, 226–229.
- Dorsch S., Kaufmann B., Schaible U., Prohaska E., Wolf H., Modrow S. (2001). The VP1-unique region of parvovirus B19: amino acid variability and antigenic stability. *J. Gen. Virol.* 82, 191–199.
- Dorsch S., Liebisch G., Kaufmann B., von Landenberg P., Hoffmann J.H., Drobnik W., Modrow S. (2002). The VP1 unique region of parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2-like activity. *J. Virol.* 76, 2014–2018.

- Douvoyiannis M., Litman N., Goldman D.L. (2009). Neurologic manifestations associated with parvovirus B19 infection. *Clin. Infect. Dis.* 48, 1713–1723.
- Eis-Hübinger A.M., Oldenburg J., Brackmann H.H., Matz B., Schneweis K.E. (1996). The prevalence of antibody to parvovirus B19 in hemophiliacs and in the general population. *Zentralbl. Bakteriол.* 284, 232–240.
- Ekman A., Hokynar K., Kakkola L., Kantola K., Hedman L., Bondén H., Gessner M., Aberham C., Norja P., *et al.* (2007). Biological and immunological relations among human parvovirus B19 genotypes 1 to 3. *J. Virol.* 81, 6927–6935.
- Enders M., Klingel K., Weidner A., Baisch C., Kandolf R., Schalasta G., Enders G. (2010). Risk of fetal hydrops and non-hydrops late intrauterine fetal death after gestational parvovirus B19 infection. *J. Clin. Virol.* 49, 163–168.
- Enders M., Schalasta G., Baisch C., Weidner A., Pukkila L., Kaikkonen L., Lankinen H., Hedman L., Söderlund-Venermo M., Hedman K. (2006). Human parvovirus B19 infection during pregnancy--value of modern molecular and serological diagnostics. *J. Clin. Virol.* 35, 400–406.
- Enders M., Weidner A., Rosenthal T., Baisch C., Hedman L., Söderlund-Venermo M., Hedman K. (2008). Improved diagnosis of gestational parvovirus B19 infection at the time of nonimmune fetal hydrops. *J. Infect. Dis.* 197, 58–62.
- Erdman D.D., Usher M.J., Tsou C., Caul E.O., Gary G.W., Kajigaya S., Young N.S., Anderson L.J. (1991). Human parvovirus B19 specific IgG, IgA, and IgM antibodies and DNA in serum specimens from persons with erythema infectiosum. *J. Med. Virol.* 35, 110–115.
- Faden H., Gary G.W. Jr, Anderson L.J. (1992). Chronic parvovirus infection in a presumably immunologically healthy woman. *Clin. Infect. Dis.* 15, 595–597.
- Filippone C., Franssila R., Kumar A., Saikko L., Kovanen P.E., Söderlund-Venermo M., Hedman K. (2010). Erythroid progenitor cells expanded from peripheral blood without mobilization or preselection: molecular characteristics and functional competence. *PLoS ONE* 5, e9496.
- Filippone C., Zhi N., Wong S., Lu J., Kajigaya S., Gallinella G., Kakkola L., Söderlund-Venermo M., Young N.S., Brown K.E. (2008). VP1u phospholipase activity is critical for infectivity of full-length parvovirus B19 genomic clones. *Virology* 374, 444–452.
- Flunker G., Peters A., Wiersbitzky S., Modrow S., Seidel W. (1998). Persistent parvovirus B19 infections in immunocompromised children. *Med. Microbiol. Immunol.* 186, 189–194.
- Franssila R., Hokynar K., Hedman K. (2001). T helper cell-mediated in vitro responses of recently and remotely infected subjects to a candidate recombinant vaccine for human parvovirus b19. *J. Infect. Dis.* 183, 805–809.

- Freyssinier J.M., Lecoq-Lafon C., Amsellem S., Picard F., Ducrocq R., Mayeux P., Lacombe C., Fichelson S. (1999). Purification, amplification and characterization of a population of human erythroid progenitors. *Br. J. Haematol.* 106, 912–922.
- Gahéry-Ségard H., Juillard V., Gaston J., Lengagne R., Pavirani A., Boulanger P., Guillet J.G. (1997). Humoral immune response to the capsid components of recombinant adenoviruses: routes of immunization modulate virus-induced Ig subclass shifts. *Eur. J. Immunol.* 27, 653–659.
- Gareus R., Gigler A., Hemauer A., Leruez-Ville M., Morinet F., Wolf H., Modrow S. (1998). Characterization of cis-acting and NS1 protein-responsive elements in the p6 promoter of parvovirus B19. *J. Virol.* 72, 609–616.
- Giarratana M.-C., Kobari L., Lapillonne H., Chalmers D., Kiger L., Cynober T., Marden M.C., Wajcman H., Douay L. (2005). Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 23, 69–74.
- Gigler A., Dorsch S., Hemauer A., Williams C., Kim S., Young N.S., Zolla-Pazner S., Wolf H., Gorny M.K., Modrow S. (1999). Generation of neutralizing human monoclonal antibodies against parvovirus B19 proteins. *J. Virol.* 73, 1974–1979.
- Gonçalves G., Correia A.M., Palminha P., Rebelo-Andrade H., Alves A. (2005). Outbreaks caused by parvovirus B19 in three Portuguese schools. *Euro Surveill.* 10, 121–124.
- Gray J.J., Cohen B.J., Desselberger U. (1993). Detection of human parvovirus B19-specific IgM and IgG antibodies using a recombinant viral VP1 antigen expressed in insect cells and estimation of time of infection by testing for antibody avidity. *J. Virol. Methods* 44, 11–23.
- Hafenstein S., Bowman V.D., Sun T., Nelson C.D.S., Palermo L.M., Chipman P.R., Battisti A.J., Parrish C.R., Rossmann M.G. (2009). Structural comparison of different antibodies interacting with parvovirus capsids. *J. Virol.* 83, 5556–5566.
- Hanada T., Koike K., Takeya T., Nagasawa T., Matsunaga Y., Takita H. (1988). Human parvovirus B19-induced transient pancytopenia in a child with hereditary spherocytosis. *Br. J. Haematol.* 70, 113–115.
- Harbison C.E., Chiorini J.A., Parrish C.R. (2008). The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. *Trends Microbiol.* 16, 208–214.
- Heegaard E.D., Petersen B.L., Heilmann C.J., Hornsleth A. (2002). Prevalence of parvovirus B19 and parvovirus V9 DNA and antibodies in paired bone marrow and serum samples from healthy individuals. *J. Clin. Microbiol.* 40, 933–936.
- Hemauer A., Gigler A., Gareus R., Reichle A., Wolf H., Modrow S. (1999). Infection of apheresis cells by parvovirus B19. *J. Gen. Virol.* 80 (Pt 3), 627–630.
- Hemauer A., Gigler A., Searle K., Beckenlehner K., Raab U., Broliden K., Wolf H., Enders G., Modrow S. (2000). Seroprevalence of parvovirus B19 NS1-specific IgG in

- B19-infected and uninfected individuals and in infected pregnant women. *J. Med. Virol.* 60, 48–55.
- Hourfar M.K., Mayr-Wohlfart U., Themann A., Sireis W., Seifried E., Schrezenmeier H., Schmidt M. (2011). Recipients potentially infected with parvovirus B19 by red blood cell products. *Transfusion* 51, 129–136.
- Hübschen J.M., Mihneva Z., Mentis A.F., Schneider F., Aboudy Y., Grossman Z., Rudich H., Kasymbekova K., Sarv I., *et al.* (2009). Phylogenetic analysis of human parvovirus b19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3735–3738.
- Isobe Y., Sugimoto K., Shiraki Y., Nishitani M., Koike K., Oshimi K. (2004). Successful high-titer immunoglobulin therapy for persistent parvovirus B19 infection in a lymphoma patient treated with rituximab-combined chemotherapy. *Am. J. Hematol.* 77, 370–373.
- Janeway C., Murphy K., Travers P., Walport M. (2009). *Immunologie*. 7. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.
- Jensen I.P., Vestergaard B.F. (1997). Assessment of the specificity of a commercial human parvovirus B19 IgM assay. *Clin Diagn Virol* 7, 133–137.
- Jones L.P., Erdman D.D., Anderson L.J. (1999). Prevalence of antibodies to human parvovirus B19 nonstructural protein in persons with various clinical outcomes following B19 infection. *J. Infect. Dis.* 180, 500–504.
- Jordan J.A., DeLoia J.A. (1999). Globoside expression within the human placenta. *Placenta* 20, 103–108.
- Kajigaya S., Fujii H., Field A., Anderson S., Rosenfeld S., Anderson L.J., Shimada T., Young N.S. (1991). Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 4646–4650.
- Kajigaya S., Shimada T., Fujita S., Young N.S. (1989). A genetically engineered cell line that produces empty capsids of B19 (human) parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 7601–7605.
- Kaufmann J., Buccola J.M., Stead W., Rowley C., Wong M., Bates C.K. (2007). Secondary symptomatic parvovirus B19 infection in a healthy adult. *J Gen Intern Med* 22, 877–878.
- Kawase M., Momoeda M., Young N.S., Kajigaya S. (1995). Most of the VP1 unique region of B19 parvovirus is on the capsid surface. *Virology* 211, 359–366.
- Kelly H.A., Siebert D., Hammond R., Leydon J., Kiely P., Maskill W. (2000). The age-specific prevalence of human parvovirus immunity in Victoria, Australia compared with other parts of the world. *Epidemiol. Infect.* 124, 449–457.

- Kempe A., Rösing B., Berg C., Kamil D., Heep A., Gembruch U., Geipel A. (2007). First-trimester treatment of fetal anemia secondary to parvovirus B19 infection. *Ultrasound Obstet Gynecol* 29, 226–228.
- Kerr J.R., Gough J., Richards S.C.M., Main J., Enlander D., McCreary M., Komaroff A.L., Chia J.K. (2010). Antibody to parvovirus B19 nonstructural protein is associated with chronic arthralgia in patients with chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis. *J. Gen. Virol.* 91, 893–897.
- Kingsford L., Ishizawa L.D., Hill D.W. (1983). Biological activities of monoclonal antibodies reactive with antigenic sites mapped on the G1 glycoprotein of La Crosse virus. *Virology* 129, 443–455.
- Klasse P.J., Sattentau Q.J. (2002). Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. *J. Gen. Virol.* 83, 2091–2108.
- Klepfish A., Rachmilevitch E., Schattner A. (2006). Parvovirus B19 reactivation presenting as neutropenia after rituximab treatment. *Eur. J. Intern. Med.* 17, 505–507.
- Kooistra K., Mesman H.J., de Waal M., Koppelman M.H.G.M., Zaaier H.L. (2011). Epidemiology of high-level parvovirus B19 viraemia among Dutch blood donors, 2003–2009. *Vox Sang.* 100, 261–266.
- Krygier D.S., Steinbrecher U.P., Petric M., Erb S.R., Chung S.W., Scudamore C.H., Buczkowski A.K., Yoshida E.M. (2009). Parvovirus B19 induced hepatic failure in an adult requiring liver transplantation. *World J. Gastroenterol.* 15, 4067–4069.
- Kueth F., Lindner J., Matschke K., Wenzel J.J., Norja P., Ploetze K., Schaal S., Kamvissi V., Bornstein S.R., *et al.* (2009). Prevalence of parvovirus B19 and human bocavirus DNA in the heart of patients with no evidence of dilated cardiomyopathy or myocarditis. *Clin. Infect. Dis.* 49, 1660–1666.
- Kühl U., Pauschinger M., Seeberg B., Lassner D., Noutsias M., Poller W., Schultheiss H.-P. (2005). Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 112, 1965–1970.
- Kunert R., Wolbank S., Stiegler G., Weik R., Katinger H. (2004). Characterization of molecular features, antigen-binding, and in vitro properties of IgG and IgM variants of 4E10, an anti-HIV type 1 neutralizing monoclonal antibody. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20, 755–762.
- Kurtzman G.J., Cohen B.J., Field A.M., Oseas R., Blaese R.M., Young N.S. (1989). Immune response to B19 parvovirus and an antibody defect in persistent viral infection. *J. Clin. Invest.* 84, 1114–1123.
- Laub R., Strengers P. (2002). Parvoviruses and blood products. *Pathol. Biol.* 50, 339–348.

- Lehmann H.W., Knöll A., Küster R.-M., Modrow S. (2003). Frequent infection with a viral pathogen, parvovirus B19, in rheumatic diseases of childhood. *Arthritis Rheum.* 48, 1631–1638.
- Lehmann H.W., Kühner L., Beckenlehner K., Müller-Godeffroy E., Heide K.-G., Küster R.-M., Modrow S. (2002). Chronic human parvovirus B19 infection in rheumatic disease of childhood and adolescence. *J. Clin. Virol.* 25, 135–143.
- Lehmann H.W., Lutterbüse N., Plentz A., Akkurt I., Albers N., Hauffa B.P., Hiort O., Schoenau E., Modrow S. (2008a). Association of parvovirus B19 infection and Hashimoto's thyroiditis in children. *Viral Immunol.* 21, 379–383.
- Lehmann H.W., Plentz A., von Landenberg P., Küster R.-M., Modrow S. (2008b). Different patterns of disease manifestations of parvovirus B19-associated reactive juvenile arthritis and the induction of antiphospholipid-antibodies. *Clin. Rheumatol.* 27, 333–338.
- Li X., Rhode S.L. 3rd (1990). Mutation of lysine 405 to serine in the parvovirus H-1 NS1 abolishes its functions for viral DNA replication, late promoter trans activation, and cytotoxicity. *J. Virol.* 64, 4654–4660.
- Liefeldt L., Plentz A., Klempa B., Kershaw O., Endres A.-S., Raab U., Neumayer H.-H., Meisel H., Modrow S. (2005). Recurrent high level parvovirus B19/genotype 2 viremia in a renal transplant recipient analyzed by real-time PCR for simultaneous detection of genotypes 1 to 3. *J. Med. Virol.* 75, 161–169.
- Lindblom A., Isa A., Norbeck O., Wolf S., Johansson B., Broliden K., Tolfvenstam T. (2005). Slow clearance of human parvovirus B19 viremia following acute infection. *Clin. Infect. Dis.* 41, 1201–1203.
- Lindner J., Barabas S., Saar K., Altmann D., Pfister A., Fleck M., Deml L., Modrow S. (2005). CD4(+) T-cell responses against the VP1-unique region in individuals with recent and persistent parvovirus B19 infection. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52, 356–361.
- Liu J.M., Green S.W., Shimada T., Young N.S. (1992). A block in full-length transcript maturation in cells nonpermissive for B19 parvovirus. *J. Virol.* 66, 4686–4692.
- Lundqvist A., Tolfvenstam T., Bostic J., Söderlund M., Broliden K. (1999). Clinical and laboratory findings in immunocompetent patients with persistent parvovirus B19 DNA in bone marrow. *Scand. J. Infect. Dis.* 31, 11–16.
- Luo W., Astell C.R. (1993). A novel protein encoded by small RNAs of parvovirus B19. *Virology* 195, 448–455.
- Manaresi E., Gallinella G., Zerbini M., Venturoli S., Gentilomi G., Musiani M. (1999). IgG immune response to B19 parvovirus VP1 and VP2 linear epitopes by immunoblot assay. *J. Med. Virol.* 57, 174–178.

- Manaresi E., Zuffi E., Gallinella G., Gentilomi G., Zerbini M., Musiani M. (2001). Differential IgM response to conformational and linear epitopes of parvovirus B19 VP1 and VP2 structural proteins. *J. Med. Virol.* 64, 67–73.
- Mani B., Gerber M., Lieby P., Boschetti N., Kempf C., Ros C. (2007). Molecular mechanism underlying B19 virus inactivation and comparison to other parvoviruses. *Transfusion* 47, 1765–1774.
- Mansfeld M. (2010). Nachweis von infektiösem Parvovirus B19: In vitro Differenzierung primärer, humaner Erythrozytenvorläuferzellen und Nachweis der Virussynthese durch quantitative Polymerase-Kettenreaktion und Durchflusszytometrie. Bachelorarbeit in Biologie, Universität Regensburg.
- Miyagawa E., Yoshida T., Takahashi H., Yamaguchi K., Nagano T., Kiriya Y., Okochi K., Sato H. (1999). Infection of the erythroid cell line, KU812Ep6 with human parvovirus B19 and its application to titration of B19 infectivity. *J. Virol. Methods* 83, 45–54.
- Modrof J., Berting A., Tille B., Klotz A., Forstner C., Rieger S., Aberham C., Gessner M., Kreil T.R. (2008). Neutralization of human parvovirus B19 by plasma and intravenous immunoglobulins. *Transfusion* 48, 178–186.
- Modrow S., Bredl S. (2010). Parvovirus B19: Brauchen wir einen Impfstoff gegen die Ringelröteln. *ImpfDialog* 3, 93–100.
- Modrow S., Falke D., Truyen U., Schätzl H. (2010). *Molekulare Virologie*. 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.
- Modrow S., Gärtner B. (2006). Parvovirus-B19-Infektion in der Schwangerschaft. *Dtsch Arztebl* 43, 2869–2876.
- Modrow S., Wenzel J.J., Schimanski S., Schwarzbeck J., Rothe U., Oldenburg J., Jilg W., Eis-Hübing A.M. (2011). Prevalence of nucleic acid sequences specific for human parvoviruses, hepatitis A and hepatitis E viruses in coagulation factor concentrates. *Vox Sang.* 100, 351–358.
- Moffatt S., Yaegashi N., Tada K., Tanaka N., Sugamura K. (1998). Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J. Virol.* 72, 3018–3028.
- Mogensen T.H., Jensen J.M.B., Hamilton-Dutoit S., Larsen C.S. (2010). Chronic hepatitis caused by persistent parvovirus B19 infection. *BMC Infect. Dis.* 10, 246.
- Momoeda M., Wong S., Kawase M., Young N.S., Kajigaya S. (1994). A putative nucleoside triphosphate-binding domain in the nonstructural protein of B19 parvovirus is required for cytotoxicity. *J. Virol.* 68, 8443–8446.
- Morey A.L., Ferguson D.J., Fleming K.A. (1993). Ultrastructural features of fetal erythroid precursors infected with parvovirus B19 in vitro: evidence of cell death by apoptosis. *J. Pathol.* 169, 213–220.

- Morey A.L., Patou G., Myint S., Fleming K.A. (1992). In vitro culture for the detection of infectious human parvovirus B19 and B19-specific antibodies using foetal haematopoietic precursor cells. *J. Gen. Virol.* 73 (Pt 12), 3313–3317.
- Morita E., Nakashima A., Asao H., Sato H., Sugamura K. (2003). Human parvovirus B19 nonstructural protein (NS1) induces cell cycle arrest at G(1) phase. *J. Virol.* 77, 2915–2921.
- Morita E., Tada K., Chisaka H., Asao H., Sato H., Yaegashi N., Sugamura K. (2001). Human parvovirus B19 induces cell cycle arrest at G(2) phase with accumulation of mitotic cyclins. *J. Virol.* 75, 7555–7563.
- Mortimer P.P. (1996). Antibody tests: progress and pitfalls. *Clin Diagn Virol* 5, 131–136.
- Mortimer P.P., Humphries R.K., Moore J.G., Purcell R.H., Young N.S. (1983). A human parvovirus-like virus inhibits haematopoietic colony formation in vitro. *Nature* 302, 426–429.
- Moyron-Quiroz J.E., McCausland M.M., Kageyama R., Sette A., Crotty S. (2009). The smallpox vaccine induces an early neutralizing IgM response. *Vaccine* 28, 140–147.
- Munakata Y., Saito-Ito T., Kumura-Ishii K., Huang J., Kodera T., Ishii T., Hirabayashi Y., Koyanagi Y., Sasaki T. (2005). Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood* 106, 3449–3456.
- Munshi N.C., Zhou S., Woody M.J., Morgan D.A., Srivastava A. (1993). Successful replication of parvovirus B19 in the human megakaryocytic leukemia cell line MB-02. *J. Virol.* 67, 562–566.
- Musiani M., Zerbini M., Gentilomi G., Plazzi M., Gallinella G., Venturoli S. (1995). Parvovirus B19 clearance from peripheral blood after acute infection. *J. Infect. Dis.* 172, 1360–1363.
- Nelson C.D.S., Palermo L.M., Hafenstein S.L., Parrish C.R. (2007). Different mechanisms of antibody-mediated neutralization of parvoviruses revealed using the Fab fragments of monoclonal antibodies. *Virology* 361, 283–293.
- Nimmerjahn F., Ravetch J.V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 34–47.
- Norja P., Hokynar K., Aaltonen L.-M., Chen R., Ranki A., Partio E.K., Kiviluoto O., Davidkin I., Leivo T., *et al.* (2006). Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 7450–7453.
- O'Malley A., Barry-Kinsella C., Hughes C., Kelehan P., Devaney D., Mooney E., Gillan J. (2003). Parvovirus infects cardiac myocytes in hydrops fetalis. *Pediatr. Dev. Pathol.* 6, 414–420.

- Oğuz F., Akdeniz C., Ünüvar E., Küçükbasmacı O., Sidal M. (2002). Parvovirus B19 in the acute arthropathies and juvenile rheumatoid arthritis. *J Paediatr Child Health* 38, 358–362.
- Oh D.J., Lee Y.L., Kang J.W., Kwon S.Y., Cho N.S. (2010). Investigation of the prevalence of human parvovirus B19 DNA in Korean plasmapheresis donors. *Korean J Lab Med* 30, 58–64.
- Ozawa K., Ayub J., Hao Y.S., Kurtzman G., Shimada T., Young N. (1987a). Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. *J. Virol.* 61, 2395–2406.
- Ozawa K., Ayub J., Kajigaya S., Shimada T., Young N. (1988). The gene encoding the nonstructural protein of B19 (human) parvovirus may be lethal in transfected cells. *J. Virol.* 62, 2884–2889.
- Ozawa K., Kurtzman G., Young N. (1986). Replication of the B19 parvovirus in human bone marrow cell cultures. *Science* 233, 883–886.
- Ozawa K., Kurtzman G., Young N. (1987b). Productive infection by B19 parvovirus of human erythroid bone marrow cells in vitro. *Blood* 70, 384–391.
- Ozawa K., Young N. (1987). Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. *J. Virol.* 61, 2627–2630.
- Palmer P., Pallier C., Leruez-Ville M., Deplanche M., Morinet F. (1996). Antibody response to human parvovirus B19 in patients with primary infection by immunoblot assay with recombinant proteins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3, 236–238.
- Pasquinelli G., Bonvicini F., Foroni L., Salfi N., Gallinella G. (2009). Placental endothelial cells can be productively infected by Parvovirus B19. *J. Clin. Virol.* 44, 33–38.
- Pattison J.R., Jones S.E., Hodgson J., Davis L.R., White J.M., Stroud C.E., Murtaza L. (1981). Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle-cell anaemia. *Lancet* 1, 664–665.
- Pavlovic M., Kats A., Cavallo M., Shoenfeld Y. (2010). Clinical and molecular evidence for association of SLE with parvovirus B19. *Lupus* 19, 783–792.
- Pfrepper K.-I., Enders M., Motz M. (2005). Human parvovirus B19 serology and avidity using a combination of recombinant antigens enables a differentiated picture of the current state of infection. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52, 362–365.
- Pillet S., Annan Z., Fichelson S., Morinet F. (2003). Identification of a nonconventional motif necessary for the nuclear import of the human parvovirus B19 major capsid protein (VP2). *Virology* 306, 25–32.

- Plentz A., Hahn J., Knöll A., Holler E., Jilg W., Modrow S. (2005). Exposure of hematologic patients to parvovirus B19 as a contaminant of blood cell preparations and blood products. *Transfusion* 45, 1811–1815.
- von Poblitzki A., Gerdes C., Reischl U., Wolf H., Modrow S. (1996). Lymphoproliferative responses after infection with human parvovirus B19. *J. Virol.* 70, 7327–7330.
- von Poblitzki A., Gigler A., Lang B., Wolf H., Modrow S. (1995). Antibodies to parvovirus B19 NS-1 protein in infected individuals. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 3), 519–527.
- Poole B.D., Zhou J., Grote A., Schiffenbauer A., Naides S.J. (2006). Apoptosis of liver-derived cells induced by parvovirus B19 nonstructural protein. *J. Virol.* 80, 4114–4121.
- Public Health Laboratory Service Working Party on Fifth Disease (1990). Prospective study of human parvovirus (B19) infection in pregnancy. Public Health Laboratory Service Working Party on Fifth Disease. *BMJ* 300, 1166–1170.
- Raab U., Beckenlehner K., Lowin T., Niller H.-H., Doyle S., Modrow S. (2002). NS1 protein of parvovirus B19 interacts directly with DNA sequences of the p6 promoter and with the cellular transcription factors Sp1/Sp3. *Virology* 293, 86–93.
- Rabenau H.F., Marianov B., Wicker S., Allwinn R. (2007). Comparison of the neutralizing and ELISA antibody titres to measles virus in human sera and in gamma globulin preparations. *Med. Microbiol. Immunol.* 196, 151–155.
- Reading S.A., Dimmock N.J. (2007). Neutralization of animal virus infectivity by antibody. *Arch. Virol.* 152, 1047–1059.
- Reid D.M., Reid T.M., Brown T., Rennie J.A., Eastmond C.J. (1985). Human parvovirus-associated arthritis: a clinical and laboratory description. *Lancet* 1, 422–425.
- Röhler C., Gärtner B., Sauerbrei A., Böhm S., Hottenträger B., Raab U., Thierfelder W., Wutzler P., Modrow S. (2008). Seroprevalence of parvovirus B19 in the German population. *Epidemiol. Infect.* 136, 1564–1575.
- Ros C., Baltzer C., Mani B., Kempf C. (2006a). Parvovirus uncoating in vitro reveals a mechanism of DNA release without capsid disassembly and striking differences in encapsidated DNA stability. *Virology* 345, 137–147.
- Ros C., Gerber M., Kempf C. (2006b). Conformational changes in the VP1-unique region of native human parvovirus B19 lead to exposure of internal sequences that play a role in virus neutralization and infectivity. *J. Virol.* 80, 12017–12024.
- Rosenfeld S.J., Yoshimoto K., Kajigaya S., Anderson S., Young N.S., Field A., Warrenner P., Bansal G., Collett M.S. (1992). Unique region of the minor capsid protein of human parvovirus B19 is exposed on the virion surface. *J. Clin. Invest.* 89, 2023–2029.

- Saarinen U.M., Chorba T.L., Tattersall P., Young N.S., Anderson L.J., Palmer E., Coccia P.F. (1986). Human parvovirus B19-induced epidemic acute red cell aplasia in patients with hereditary hemolytic anemia. *Blood* 67, 1411–1417.
- Saikawa T., Anderson S., Momoeda M., Kajigaya S., Young N.S. (1993). Neutralizing linear epitopes of B19 parvovirus cluster in the VP1 unique and VP1-VP2 junction regions. *J. Virol.* 67, 3004–3009.
- Saito T., Munakata Y., Fu Y., Fujii H., Kodera T., Miyagawa E., Ishii K., Sasaki T. (2003). Evaluation of anti-parvovirus B19 activity in sera by assay using quantitative polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 107, 81–87.
- Santagostino E., Mannucci P.M., Gringeri A., Azzi A., Morfini M., Musso R., Santoro R., Schiavoni M. (1997). Transmission of parvovirus B19 by coagulation factor concentrates exposed to 100 degrees C heat after lyophilization. *Transfusion* 37, 517–522.
- Sato H., Hirata J., Furukawa M., Kuroda N., Shiraki H., Maeda Y., Okochi K. (1991a). Identification of the region including the epitope for a monoclonal antibody which can neutralize human parvovirus B19. *J. Virol.* 65, 1667–1672.
- Sato H., Hirata J., Kuroda N., Shiraki H., Maeda Y., Okochi K. (1991b). Identification and mapping of neutralizing epitopes of human parvovirus B19 by using human antibodies. *J. Virol.* 65, 5485–5490.
- Sato H., Takakura F., Kojima E., Fukada K., Okochi K., Maeda Y. (1995). Screening of blood donors for human parvovirus B19. *Lancet* 346, 1237–1238.
- Schenk T., Enders M., Pollak S., Hahn R., Huzly D. (2009). High prevalence of human parvovirus B19 DNA in myocardial autopsy samples from subjects without myocarditis or dilative cardiomyopathy. *J. Clin. Microbiol.* 47, 106–110.
- Schmidt M., Themann A., Drexler C., Bayer M., Lanzer G., Menichetti E., Lechner S., Wessin D., Prokoph B., *et al.* (2007). Blood donor screening for parvovirus B19 in Germany and Austria. *Transfusion* 47, 1775–1782.
- Schmitz H., Essuman S. (1986). Comparison of the neutralizing and ELISA antibody titres to human cytomegalovirus (HCMV) in human sera and in gamma globulin preparations. *J. Med. Virol.* 20, 177–182.
- Schneider B., Höne A., Tolba R.H., Fischer H.-P., Blümel J., Eis-Hübinger A.M. (2008). Simultaneous persistence of multiple genome variants of human parvovirus B19. *J. Gen. Virol.* 89, 164–176.
- Schwarz T.F., Serke S., Hottenträger B., von Brunn A., Baurmann H., Kirsch A., Stolz W., Huhn D., Deinhardt F., Roggendorf M. (1992). Replication of parvovirus B19 in hematopoietic progenitor cells generated in vitro from normal human peripheral blood. *J. Virol.* 66, 1273–1276.

- Schwarz T.F., Wiersbitzky S., Pambor M. (1994). Case report: detection of parvovirus B19 in a skin biopsy of a patient with erythema infectiosum. *J. Med. Virol.* 43, 171–174.
- Searle K., Schalasta G., Enders G. (1998). Development of antibodies to the nonstructural protein NS1 of parvovirus B19 during acute symptomatic and subclinical infection in pregnancy: implications for pathogenesis doubtful. *J. Med. Virol.* 56, 192–198.
- Serjeant G.R., Topley J.M., Mason K., Serjeant B.E., Pattison J.R., Jones S.E., Mohamed R. (1981). Outbreak of aplastic crises in sickle cell anaemia associated with parvovirus-like agent. *Lancet* 2, 595–597.
- Serke S., Schwarz T.F., Baumann H., Kirsch A., Hottenträger B., Von Brunn A., Roggendorf M., Huhn D., Deinhardt F. (1991). Productive infection of in vitro generated haemopoietic progenitor cells from normal human adult peripheral blood with parvovirus B19: studies by morphology, immunocytochemistry, flow-cytometry and DNA-hybridization. *Br. J. Haematol.* 79, 6–13.
- Servant A., Laperche S., Lallemand F., Marinho V., De Saint Maur G., Meritet J.F., Garbarg-Chenon A. (2002). Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *J. Virol.* 76, 9124–9134.
- Shade R.O., Blundell M.C., Cotmore S.F., Tattersall P., Astell C.R. (1986). Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *J. Virol.* 58, 921–936.
- Shimomura S., Komatsu N., Frickhofen N., Anderson S., Kajigaya S., Young N.S. (1992). First continuous propagation of B19 parvovirus in a cell line. *Blood* 79, 18–24.
- Simon F., Rahimy C., Krivine A., Levine M., Pepin J.M., Lapierre D., Denamur E., Vernoux L., De Crepy A., Blot P. (1993). Antibody avidity measurement and immune complex dissociation for serological diagnosis of vertically acquired HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 6, 201–207.
- Söderlund M., Brown C.S., Cohen B.J., Hedman K. (1995a). Accurate serodiagnosis of B19 parvovirus infections by measurement of IgG avidity. *J. Infect. Dis.* 171, 710–713.
- Söderlund M., Brown C.S., Spaan W.J., Hedman L., Hedman K. (1995b). Epitope type-specific IgG responses to capsid proteins VP1 and VP2 of human parvovirus B19. *J. Infect. Dis.* 172, 1431–1436.
- Söderlund M., von Essen R., Haapasaari J., Kiistala U., Kiviluoto O., Hedman K. (1997). Persistence of parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy. *Lancet* 349, 1063–1065.
- Sosa C.E., Mahony J.B., Luinstra K.E., Sternbach M., Chernesky M.A. (1992). Replication and cytopathology of human parvovirus B19 in human umbilical cord blood erythroid progenitor cells. *J. Med. Virol.* 36, 125–130.

- Spivak J.L. (2005). The anaemia of cancer: death by a thousand cuts. *Nat. Rev. Cancer* 5, 543–555.
- Srivastava C.H., Zhou S., Munshi N.C., Srivastava A. (1992). Parvovirus B19 replication in human umbilical cord blood cells. *Virology* 189, 456–461.
- St Amand J., Astell C.R. (1993). Identification and characterization of a family of 11-kDa proteins encoded by the human parvovirus B19. *Virology* 192, 121–131.
- Stewart G.C., Lopez-Molina J., Gottumukkala R.V.S.R.K., Rosner G.F., Anello M.S., Hecht J.L., Winters G.L., Padera R.F., Baughman K.L., Lipes M.A. (2011). Myocardial parvovirus B19 persistence: lack of association with clinicopathologic phenotype in adults with heart failure. *Circ Heart Fail* 4, 71–78.
- Streitz M., Noutsias M., Volkmer R., Rohde M., Brestrich G., Block A., Klippert K., Kotsch K., Ay B., *et al.* (2008). NS1 specific CD8+ T-cells with effector function and TRBV11 dominance in a patient with parvovirus B19 associated inflammatory cardiomyopathy. *PLoS ONE* 3, e2361.
- Summers J., Jones S.E., Anderson M.J. (1983). Characterization of the genome of the agent of erythrocyte aplasia permits its classification as a human parvovirus. *J. Gen. Virol.* 64 (Pt 11), 2527–2532.
- Takahashi M., Ito M., Sakamoto F., Shimizu N., Furukawa T., Takahashi M., Matsunaga Y. (1995). Human parvovirus B19 infection: immunohistochemical and electron microscopic studies of skin lesions. *J. Cutan. Pathol.* 22, 168–172.
- Takahashi T., Ozawa K., Takahashi K., Asano S., Takaku F. (1990). Susceptibility of human erythropoietic cells to B19 parvovirus in vitro increases with differentiation. *Blood* 75, 603–610.
- Takahashi T., Ozawa K., Takahashi K., Okuno Y., Takahashi T., Muto Y., Takaku F., Asano S. (1993). DNA replication of parvovirus B 19 in a human erythroid leukemia cell line (JK-1) in vitro. *Arch. Virol.* 131, 201–208.
- Takano T., Yamada K. (2007). Quantitation of human parvovirus B19 DNA by real-time polymerase chain reaction. *Pediatr Int* 49, 459–462.
- Thomas H.I., Barrett E., Hesketh L.M., Wynne A., Morgan-Capner P. (1999). Simultaneous IgM reactivity by EIA against more than one virus in measles, parvovirus B19 and rubella infection. *J. Clin. Virol.* 14, 107–118.
- Tolfvenstam T., Oxenius A., Price D.A., Shacklett B.L., Spiegel H.M., Hedman K., Norbeck O., Levi M., Olsen K., *et al.* (2001). Direct ex vivo measurement of CD8(+) T-lymphocyte responses to human parvovirus B19. *J. Virol.* 75, 540–543.
- Tuuminen T., Hedman K., Söderlund-Venermo M., Seppälä I. (2011). Acute parvovirus B19 infection causes nonspecificity frequently in *Borrelia* and less often in *Salmonella* and *Campylobacter* serology, posing a problem in diagnosis of infectious arthropathy. *Clin. Vaccine Immunol.* 18, 167–172.

- Venturoli S., Gallinella G., Manaresi E., Gentilomi G., Musiani M., Zerbini M. (1998). IgG response to the immunoreactive region of parvovirus B19 nonstructural protein by immunoblot assay with a recombinant antigen. *J. Infect. Dis.* 178, 1826–1829.
- Wegner C.C., Jordan J.A. (2004). Human parvovirus B19 VP2 empty capsids bind to human villous trophoblast cells in vitro via the globoside receptor. *Infect Dis Obstet Gynecol* 12, 69–78.
- Weigel-Kelley K.A., Yoder M.C., Srivastava A. (2001). Recombinant human parvovirus B19 vectors: erythrocyte P antigen is necessary but not sufficient for successful transduction of human hematopoietic cells. *J. Virol.* 75, 4110–4116.
- Weigel-Kelley K.A., Yoder M.C., Srivastava A. (2003). Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry. *Blood* 102, 3927–3933.
- Weissbrich B., Süss-Fröhlich Y., Girschick H.J. (2007). Seroprevalence of parvovirus B19 IgG in children affected by juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 9, R82.
- White D.G., Woolf A.D., Mortimer P.P., Cohen B.J., Blake D.R., Bacon P.A. (1985). Human parvovirus arthropathy. *Lancet* 1, 419–421.
- Wong S., Brown K.E. (2006). Development of an improved method of detection of infectious parvovirus B19. *J. Clin. Virol.* 35, 407–413.
- Wong S., Keyvanfar K., Wan Z., Kajigaya S., Young N.S., Zhi N. (2010). Establishment of an erythroid cell line from primary CD36+ erythroid progenitor cells. *Exp. Hematol.* 38, 994–1005.e1–2.
- Wong S., Zhi N., Filippone C., Keyvanfar K., Kajigaya S., Brown K.E., Young N.S. (2008). Ex vivo-generated CD36+ erythroid progenitors are highly permissive to human parvovirus B19 replication. *J. Virol.* 82, 2470–2476.
- Woolf A.D., Campion G.V., Chishick A., Wise S., Cohen B.J., Klouda P.T., Caul O., Dieppe P.A. (1989). Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults. *Arch. Intern. Med.* 149, 1153–1156.
- Yaegashi N., Shiraishi H., Takeshita T., Nakamura M., Yajima A., Sugamura K. (1989). Propagation of human parvovirus B19 in primary culture of erythroid lineage cells derived from fetal liver. *J. Virol.* 63, 2422–2426.
- Yoshimoto K., Rosenfeld S., Frickhofen N., Kennedy D., Hills R., Kajigaya S., Young N.S. (1991). A second neutralizing epitope of B19 parvovirus implicates the spike region in the immune response. *J. Virol.* 65, 7056–7060.
- Young N.S., Mortimer P.P., Moore J.G., Humphries R.K. (1984). Characterization of a virus that causes transient aplastic crisis. *J. Clin. Invest.* 73, 224–230.

Yu P.B., Holzknacht Z.E., Bruno D., Parker W., Platt J.L. (1996). Modulation of natural IgM binding and complement activation by natural IgG antibodies: a role for IgG anti-Gal alpha1-3Gal antibodies. *J. Immunol.* 157, 5163–5168.

Yunoki M., Tsujikawa M., Urayama T., Sasaki Y., Morita M., Tanaka H., Hattori S., Takechi K., Ikuta K. (2003). Heat sensitivity of human parvovirus B19. *Vox Sang.* 84, 164–169.

Zádori Z., Szelei J., Lacoste M.C., Li Y., Gariépy S., Raymond P., Allaire M., Nabi I.R., Tijssen P. (2001). A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev. Cell* 1, 291–302.

Zuffi E., Manaresi E., Gallinella G., Gentilomi G.A., Venturoli S., Zerbini M., Musiani M. (2001). Identification of an immunodominant peptide in the parvovirus B19 VP1 unique region able to elicit a long-lasting immune response in humans. *Viral Immunol.* 14, 151–158.

Kongressbeiträge

Poster

21. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Freiburg, 2011. Robert Heyd, Martin Mansfeld, Simon Bredl und Susanne Modrow: Characterization of the neutralizing activity of monoclonal antibodies against parvovirus B19 using infection assays based on flow cytometry.

Vortrag

XIVth International Parvovirus Workshop, Ithaca/NY, USA, 2012. Robert Heyd, Simon Bredl, Martin Mansfeld, Hartwig Lehmann und Susanne Modrow: Characterization of parvovirus B19 neutralizing activities of VP1/VP2-specific monoclonals and of antibodies in human sera.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Modrow für die Überlassung des Themas sowie allen damit verbundenen Einblicken in die Welt der (Parvo-)Viren bedanken. Besonders interessant waren für mich die Teilnahmen an internationalen Kongressen zur Präsentation meiner Ergebnisse.

Dr. Simon Bredl möchte ich herzlich für die Einarbeitung in den Laboralltag der AG Modrow und alle notwendigen Kenntnisse und Methoden danken.

In diesem Zusammenhang sage ich auch allen Praktikanten der AG Modrow, die im Rahmen ihrer Bachelor- und Masterarbeiten in den Fächern Biologie bzw. Biochemie hilfreiche Beiträge zu meiner Arbeit geliefert haben, ein „Herzliches Dankeschön!“. Hervorzuheben ist hier besonders Martin Mansfeld, von dem ich den „Staffelstab“ für die Zellkultur übernommen habe.

Ein großer Dank geht an Dr. Jens Wild für wertvolle Tipps rund um die Durchflusszytometrie.

Vielen Dank auch an alle weiteren Mitarbeiter des Instituts, deren Unterstützung in meine Arbeit eingeflossen ist: u.a. die Virologische Diagnostik für Analysen der klinischen Proben, Christian Gerdes für die Aufreinigung der monoklonalen Antikörper, die Nachbar-AG Nevels/Paulus für labortechnische Tipps und Infos sowie allen Kolleginnen und Kollegen, die mit Rat und Tat zur Verfügung standen.

Ein ganz besonders herzlicher Dank geht an Ines Tschertner, Evi Lang und Sylvia Allmeier für die abwechslungsreichen Kaffeepausen und die interessanten Gespräche!

Mein Dank geht ebenfalls an Herrn Prof. Dr. Lehmann, Leiter des Bereichs Kinderrheumatologie am Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Giessen, der uns zahlreiche Patientenproben zur Verfügung stellte.

Mein abschließender Dank gilt allen Personen, die meine Arbeit mit ihren Blutspenden unterstützt haben. Vor allem gilt dies für die Probanden, die über viele Monate regelmäßig für umfangreiche Blutentnahmen zur Gewinnung der PBMCs zur Verfügung standen und damit die Grundlage der Experimente bildeten. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!